



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
PROGRAMA DE DOCTORADO BIOCENCIAS MOLECULARES 99/2011

Regulación de la homeostasis glucémica y del metabolismo lipídico por el factor de transcripción ALX3.

Laura Ruiz Cañas
Madrid, 2017

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



Regulación de la homeostasis glucémica y del metabolismo lipídico por el factor de transcripción ALX3.

Memoria que presenta la licenciada en Biología Laura Ruiz Cañas para optar al grado de Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de tesis: Mario Vallejo Fernández de la Reguera

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"



Agradecimientos

Al Dr. Mario Vallejo por darme la oportunidad de iniciar esta aventura científica. Al final, hemos atracado en buen puerto.

A mis compañeros de laboratorio: Toño y Merche (y Emma!). En mi primer día, Toño me enseñó a pasar células; desde entonces, no he dejado de aprender de ti. Y fui con Merche a cocina, me asombró la cantidad de gente que nos saludaba. En aquel momento pensé que eras genial. Y lo eres. Y siempre lo serás.

Patri!!!! Llevo mucho tiempo esperando este momento. Necesitaba poder dejar por escrito que eres la mejor compañera, una científica incansable e inmejorable, #lachicadelosplanesmolones, una eficaz jardinera, mejor runner y sobre todo, mi amiga. Locu para siempre.

A la Dra. Ángela Martínez Valverde. Me siento muy orgullosa de formar parte de tu laboratorio. Es tu dedicación constante lo que hace que todo funcione.

Mis chicas!!!!!! Primero, Pilar: gracias. *G49-treated animals* y tú sois mi día a día. Y con los ratones y sin ellos, quiero más risas y viajes de la EASD contigo.

Patiiii Vazquezzz!!!, te admiro.

Rada, te mereces un montón más de Rada P. et al, 20xx.

Irma y Nuria, arriba las microesferas y la metformina!

Escalona, por muchas mas canciones.

Soul, me debes un apodo.

Barahona, gracias por la camiseta y el pisto...ya tu sá..

A mi familia. A mi madre, mi diosa coronada. Tu piti ya es doctora. A Papá, cada día un poco mas iguales. Emma y Marta, estoy tan contenta que os daba un beso!!

A mi tia Vivi, ojalá algún día sea tan buena como tú. A mi abuela, que trabaja mas que yo (de verdad!!).

A León, por el amor. Gracias infinitas (y ratoquinas).

Y a vosotros. Mis amigos. Lo sois todo. Os quiero.

Laura

RESUMEN

Alx3 es un factor de transcripción de tipo homeodominio cuya expresión durante el desarrollo embrionario determina la correcta formación del tubo neural y la formación de las estructuras óseas craneofaciales. Además se conoce que en los islotes pancreáticos de animales adultos su expresión es importante para el mantenimiento de la supervivencia celular y la regulación de los genes de insulina y glucagón, de manera que su deficiencia genera un incremento de apoptosis en los islotes y alteraciones en la homeostasis glucémica. En la presente tesis hemos demostrado que estos defectos se asocian a un incremento de estrés oxidativo en los islotes como consecuencia de una aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo se determinó en islotes cultivados *ex vivo* mediante técnicas de fluorescencia y de peroxidación de lípidos, así como mediante la determinación inmunohistoquímica de niveles de nitrotirosina. En relación con la implicación de *Alx3* en la maquinaria de defensa antioxidativa, observamos que su expresión es necesaria para la síntesis de enzimas antioxidantes como la catalasa, la glutatión peroxidasa 1 y la manganeso superóxido dismutasa. La deficiencia de *Alx3* incrementa la vulnerabilidad mitocondrial y está probablemente relacionada con el daño tisular observado en los islotes.

Por otro lado, la administración de una dieta hipercalórica produjo un mayor aumento de estrés oxidativo en islotes de ratones deficientes en *Alx3*, que a su vez no mostraron la esperada hiperplasia en respuesta a la sobrecarga metabólica. Sorprendentemente, al contrario que en animales alimentados en dieta estándar, la ausencia de *Alx3* disminuyó la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina generada por la dieta hipercalórica. También observamos una disminución en la ingesta de los animales carentes de *Alx3*, que se tradujo en una menor ganancia de peso durante el régimen de dieta hipercalórica. Por último, el examen del tejido adiposo reveló un mayor tamaño de los adipocitos en los ratones mutantes y un aumento en los genes que codifican enzimas lipogénicas.

En su conjunto, estos resultados indican la participación de *Alx3* en la regulación de la homeostasis metabólica a nivel de los islotes pancreáticos y del tejido adiposo.

SUMMARY

Alx3 is a homeodomain transcription factor whose expression during embryonic development determines the correct neural tube formation and the formation of craniofacial bone structures. Furthermore it is known that the expression in pancreatic islets of adult animals is important for maintaining cell survival and gene regulation of insulin and glucagon so that its deficiency results in an increase of apoptosis in the islet by glycemic homeostasis alterations. In this thesis we have shown that these defects are associated with increased oxidative stress in islets as a result of increased formation of reactive oxygen species. Oxidative stress was determined in islets cultured *ex vivo* by fluorescence techniques and lipid peroxidation as well as by immunohistochemical determination of nitrotyrosine. In relation to the involvement of *Alx3* in anti oxidative defense machinery, we have noted that its expression is required for the synthesis of antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide manganese 1 dismutase. *Alx3* deficiency increases the mitochondrial vulnerability and is probably related to the tissue damage observed in the islets.

On the other hand, administration of a high caloric diet produced a greater increase in oxidative stress in islet *Alx3* deficient mice, which in turn not showed the expected hyperplasia in response to metabolic overload. Surprisingly, unlike standard diet fed animals, the absence of *Alx3* decreased glucose intolerance and insulin resistance generated by the high calorie diet. We also observed a decrease in the intake of animals lacking *Alx3*, which resulted in a lower weight gain during caloric diet regime. Finally, examination of the adipose tissue revealed increased size of adipocytes in the mutant mice and increased lipogenic genes encoding enzymes. Taken together, these results indicate the involvement of *Alx3* in the regulation of metabolic homeostasis at the level of pancreatic islets and adipose tissue.

ABREVIATURAS.....	4
 1.- INTRODUCCIÓN.	
1.1.- La glucosa, sustrato vital.....	5
1.2.- Regulación de los niveles de glucosa.....	5
1.3.- Diabetes Mellitus.....	7
1.3.1.- Diabetes tipo I.....	8
1.3.2.- Diabetes tipo II.....	9
1.3.3.- Diabetes monogénicas.....	10
1.4.- Especies reactivas de oxígeno y metabolismo.....	12
1.4.1 Estrés oxidativo y patología diabética.....	14
1.5.- $Alx3$.....	16
 2. OBJETIVOS.....	19
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.	
3.1.-Animales de experimentación.....	20
3.1.1. -Genotipado.....	20
3.1.2.- Dietas.....	20
3.1.3.-Determinación de la glucemia.....	21
3.1.4.-Determinación de la tolerancia a la insulina.....	21
3.2.- Aislamiento de islotes de Langerhans.....	22
3.3.- Medición de ROS en islotes de Langerhan.....	23
3.4.-Extracción y fijación del páncreas para histología.....	23
3.4.1.- Inmunohistoquímica.....	24
3.4.2.- Estudio morfométrico del páncreas.....	24
3.5.-RT-PCR cuantitativa en islotes pancreáticos de ratón.....	25
3.6.-Determinación del tamaño medio de los adipocitos.....	25
3.7.- Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos.....	26

3.8.- Determinación de los niveles de triglicéridos circulantes.....	26
3.9.- Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.....	26
3.10.- Determinación de los niveles de leptina.....	27

4. RESULTADOS.

4.1.- *Alx3* y estrés oxidativo en islotes pancreáticos.

4.1.1.- La carencia de <i>Alx3</i> provoca estrés oxidativo en los islotes pancreáticos.....	28
4.1.2.- <i>Alx3</i> y el metabolismo mitocondrial.....	30
4.1.3.- Presencia de marcadores de estrés oxidativo en el páncreas de ratones.....	31
4.1.4.- Expresión de genes protectores de estrés oxidativo.....	33

4.2.- Respuesta de los ratones deficientes en *Alx3* a una dieta rica en contenido de grasa.....

4.2.1.- Incremento de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos de ratones sometidos a una dieta rica en grasas	36
4.2.2.- La deficiencia en <i>Alx3</i> previene la hiperplasia de los islotes pancreáticos en respuesta a una dieta hipercalórica.....	37
4.2.3.- El déficit de <i>Alx3</i> altera la ganancia de peso y la ingesta de ratones sometidos a dieta hipercalórica	39
4.2.4.- La deficiencia de <i>Alx3</i> disminuye la resistencia a la insulina generada por la alimentación con una dieta hipercalórica.....	40
4.2.5.- <i>Alx3</i> regula el tamaño de los adipocitos de la grasa epididimal.....	44
4.2.6.- La deficiencia de <i>Alx3</i> se acompaña de un incremento de la lipogénesis.....	47
4.2.7.- Determinación de los niveles de leptina circulante.....	49

5. DISCUSIÓN.

5.1. <i>Alx3</i> y el estrés oxidativo.....	51
5.2. <i>Alx3</i> y la regulación de la homeostasis corporal	54

6. CONCLUSIONES.....	57
-----------------------------	-----------

7. BIBLIOGRAFÍA.....	78
-----------------------------	-----------

ABREVIATURAS

CD36:	Transportador de ácidos grasos, Cluster de diferenciación 36
CIDEA:	Activador de muerte celular
DGAT1:	Diacilglicerol-o-aciltransferasa 1
FoxO:	Forkhead Homeobox type O
Gpx-1:	Glutación peroxidasa 1
IGF-1	Factor crecimiento insulínico
LPs:	Gota lipídica
MnSOD:	Manganeso superoxido dismutasa
PGC1α:	Coactivador de PPR γ
PPRγ:	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno
ROS:	Especies rectivas de oxígeno

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- La glucosa, sustrato vital

La glucosa, los ácidos grasos y los aminoácidos componen los tres sustratos esenciales de las células para el mantenimiento de la homeostasis metabólica ya que son utilizados para la obtención de energía y la biosíntesis de macromoléculas. Su disponibilidad en la sangre viene determinada por el permanente balance entre el aporte de la ingesta y el consumo tisular. De entre estos tres componentes, la glucosa representa la piedra angular del metabolismo energético.

1.2- Regulación de los niveles de glucosa

Hace casi un siglo que Frederick G. Banting y su asistente Charles H. Best descubrieron el papel central de la insulina en la captación de la glucosa por parte de las células. Esta hormona anabolizante determina la producción de energía y el almacenamiento energético en forma de carbohidratos, grasas y proteínas sintetizadas. Roger Unger, 50 años después, descubrió el glucagón como una hormona reguladora de acciones contrarias a la insulina en la disponibilidad de la glucosa: estimulador de la glucogenolisis y de la gluconeogénesis. Desde entonces, los estudios sobre la homeostasis de la glucosa plasmática han demostrado que es uno de los sistemas biológicos de regulación más complejos y precisos.

La insulina y el glucagón se sintetizan en unas diminutas agregaciones celulares endocrinas insertas en la glándula pancreática, de la que ocupan menos del 2% de su masa y se distribuyen en pequeños islotes (40-900 μm), tal y como los describiera Paul Langerhans en 1869 (Figura 1). En el ratón, la mayor parte de las células de los islotes de Langerhans (60-70%) y con una localización central, corresponden a las células β , productoras de la insulina. Las células α (10%), están en la periferia y secretan glucagón. Distribuidas aleatoriamente y constituyendo un 5% del total, están las células δ que sintetizan somatostatina y péptido intestinal vasoactivo (δ_2). También en la periferia de los islotes y sobre todo en los que se localizan en la cabeza pancreática y en el cuerpo uncinado, están las células F,

productoras de polipéptido pancreático (PP) (Robertson and Harmon, 2006). Los islotes con mayor proporción de células β y α se localizan preferencialmente en el cuerpo y en la cola pancreática.

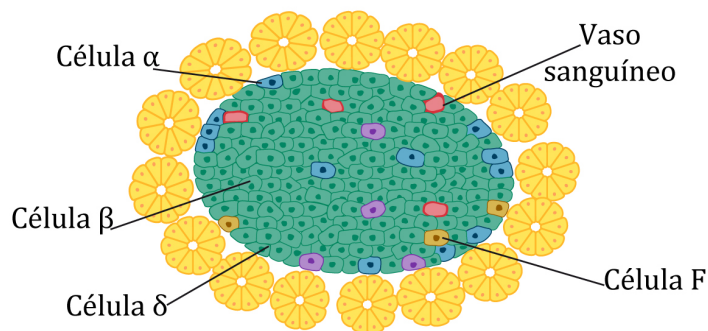


Figura 1- Representación esquemática de un islote pancreático de ratón. Los distintos tipos celulares están diferenciados según un código de colores. Las células del páncreas exocrino se representan en amarillo. Nótese la presencia de vasos sanguíneos tanto en el interior como en la periferia del islote.

Las células β pancreáticas sintetizan insulina y la secretan de modo que se mantengan los niveles de glucosa en sangre dentro de un estrecho rango. En humanos los niveles de normoglucemia se sitúan entre 70-105 mg/dl, y en el ratón se sitúa entre 100-150 mg/dl. Una vez liberada, la insulina sirve de señal a los tejidos diana (hígado, músculo y tejido adiposo) para captar glucosa. Las alteraciones en el proceso de secreción de la insulina tienen un profundo impacto sobre la homeostasis de la glucosa: una excesiva secreción causa hipoglucemia y una secreción insuficiente da lugar a diabetes.

La capacidad que poseen las células β de adaptar la secreción de insulina a las fluctuaciones de glucosa en sangre depende de la expresión de un transportador celular de glucosa de baja afinidad llamado GLUT2 (GLUT1 en humanos). Una vez en el interior de la célula, la glucosa se fosforila por la acción de la glucoquinasa, enzima limitante del proceso de secreción estimulada por la glucosa que actúa como verdadero sensor de los niveles de glucemia. Una vez fosforilada, la glucosa es susceptible de ser sometida a glucolisis generando piruvato que entra en la mitocondria. Este actúa como sustrato del ciclo de Krebs, provocando un incremento en la producción de ATP citosólico, lo que a su vez produce el cierre de los canales de

K^+ sensibles a ATP. El cierre de estos canales despolariza la membrana plasmática provocando la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a la célula a través de un gradiente electroquímico. De este modo se estimula la fusión de vesículas secretoras que contienen insulina liberándola de modo pulsátil (Figura 2) (Holz and Habener, 1992).

Los principales tejidos diana de la insulina son el músculo, el tejido adiposo y el hígado. La insulina estimula el transporte de glucosa hacia el músculo y el hígado provocando la disminución de los niveles de glucosa en sangre, incrementando el almacenamiento de carbohidratos en forma de glucógeno e inhibiendo la lipólisis en el tejido adiposo y la gluconeogénesis en el hígado.

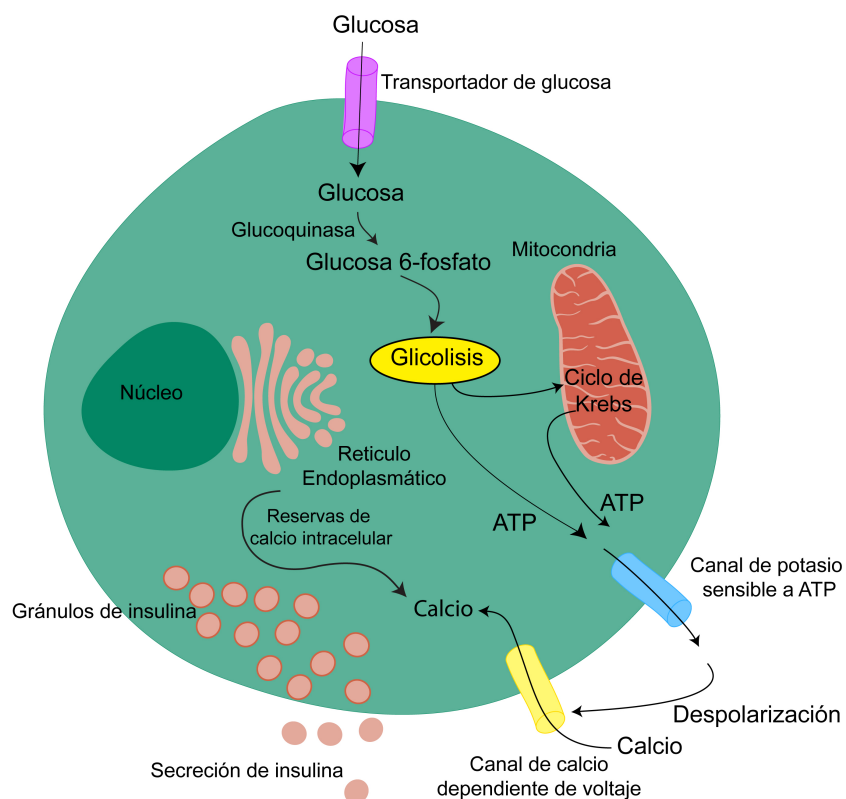


Figura 2- Representación esquemática del proceso mediante el cual se regula la secreción de insulina en las células β de los islotes de Langerhans. La célula produce ATP de manera proporcional a la cantidad de glucosa metabolizada. El ATP actúa sobre canales de potasio que despolarizan la célula y producen la entrada de calcio, el cual activa el proceso de secreción de la hormona mediante la movilización de vesículas.

1.3.-Diabetes Mellitus

Denominamos diabetes mellitus al grupo de trastornos metabólicos caracterizados por la presencia de hiperglucemia. Las causas de su aparición son

múltiples y constituyen un claro ejemplo de la interacción entre los condicionantes genéticos y ambientales en la alteración de los mecanismos íntimos de producción, consumo y de control de la glucosa (Diabetes American Association, 2014).

La hiperglucemia produce a medio o largo plazo la alteración funcional de múltiples órganos y tejidos sobre todo por afectación vascular, aumentando de esta forma el riesgo de muerte prematura (Kaneto et al., 2010). Las consecuencias patológicas más graves son el incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular, fallo renal, retinopatía diabética, amputación de extremidades por vasculopatías y alteraciones neurológicas (Giacco and Brownlee, 2010). Su alta incidencia la convierte en la octava causa directa de muerte en ambos sexos, con 1.5 millones de decesos en 2012. La prevalencia de la diabetes se ha incrementado continuamente durante las tres últimas décadas, afectando de forma mas severa a los países en vías de desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2014, existían 422 millones de personas diagnosticadas, lo que supone una prevalencia del 8,5% entre la población adulta (World Health Organization, 2016)

La diabetes mellitus se produce como consecuencia de un desequilibrio ente la cantidad de glucosa en sangre y la capacidad de la insulina de introducirla en sus órganos diana por un defecto en su secreción o en sus efectos. Dependiendo de la etiología, la diabetes puede ser de diferentes tipos.

1.3.1.- Diabetes tipo I

Es una enfermedad autoinmune crónica y progresiva cuya causa es la deficiencia de insulina debida a la pérdida de las células β de los islotes pancreáticos (Katsarou et al., 2017). Supone un 10% de los casos de los pacientes con diabetes mellitus.

El hallazgo patológico más significativo es la insulitis, proceso que se inicia con la infiltración de leucocitos y células T reactivas en los islotes de Langerhans, y que responde al desarrollo de una fuerte respuesta inflamatoria. Esto provoca una reducción en la función y en la masa celular de los islotes. Los pacientes con diabetes tipo I son absolutamente dependientes de la administración exógena de insulina. A pesar de los avances significativos de los últimos años, aún se desconocen en detalle

los defectos primarios en las células T que parecen ser la causa de la enfermedad (Bluestone et al., 2010).

1.3.2.- Diabetes tipo II

Es una enfermedad poligénica cuya fisiopatología abarca un amplio espectro de alteraciones en el control de la glucosa producidas principalmente por la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos diana (músculo, tejido adiposo e hígado), un exceso en la producción de glucosa hepática y al fallo compensatorio por parte de la célula β en la secreción de insulina (Prentki and Nolan, 2006).

La mayor parte de los pacientes diagnosticados con diabetes pertenecen a esta categoría. Este hecho está directamente relacionado con la obesidad que agrava y/o desencadena esta patología. La obesidad es en gran parte el resultado de la utilización de una dieta alimentaria con un excesivo aporte calórico en forma de grasas y azúcar, y un descenso en la actividad física diaria. Existen numerosos estudios clínicos que ponen de manifiesto la relación entre obesidad y el desarrollo de resistencia insulínica y diabetes tipo II (Lumeng and Saltiel, 2011, Hotamisligil, 2006).

La obesidad se debe a un aumento del número y tamaño de los adipocitos. El adipocito primero se hipertrofia y conforme aumenta su volumen, se produce una hiperplasia del mismo, acompañada por un cambio en la expresión de citoquinas, depleción del consumo de oxígeno, incremento en el reclutamiento de células inmunes y desregulación del metabolismo de lípidos (Osborn and Olefsky, 2012). Los adipocitos maduros secretan citoquinas entre las que cabe destacar IL-6, TNF- α , MCP-1, adiponectina y leptina que actúan como reguladores endocrinos, autocrinos o paracrinos del metabolismo de la glucosa y los lípidos. La adiponectina puede modular a la sensibilidad celular a la insulina (Shetty et al., 2009), reduce la formación de glucosa en el hígado e incrementa la oxidación de ácidos grasos. También favorece la captación de glucosa en el músculo mediante la activación de la ruta dependiente de AMPK. En los pacientes obesos se ha observado una disminución en los niveles de adiponectina y cuya administración exógena restaura la sensibilidad a la insulina (Kubota et al., 2002). La leptina posee un papel central en el metabolismo glucémico periférico ya que además de favorecer la síntesis de insulina, ejerce de señal sobre el hipotálamo, actuando como elemento anorexigénico. Los niveles circulantes de leptina

son directamente proporcionales a la cantidad de tejido graso (Ebihara et al., 2001). En respuesta a una mayor secreción de MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein*) por parte de los adipocitos, se produce un reclutamiento de monocitos al tejido adiposo donde se diferenciarán a macrófagos residentes (ATM, *Adipose tissue macrophages*) (Osborn and Olefsky, 2012). Los macrófagos están implicados en los sistemas defensivos mediante su actividad fagocítica pero también son productores de citoquinas que inducen inflamación, mayoritariamente TNF- α y movilizan nuevas células inmunes hacia el tejido adiposo. La presencia de este grado crónico de inflamación y los altos niveles de TNF- α están directamente relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina (Asghar and Sheikh, 2017, Kanda et al., 2006).

El fallo en la acción de la insulina, junto con los factores comentados anteriormente, provoca que los niveles de glucemia se mantengan por encima de los valores normales. Para compensar la hiperglucemia producida por la resistencia periférica a la insulina, los islotes de Langerhans reaccionan produciendo una hiperplasia y aumentando la secreción de insulina. Esta situación conduce a la apoptosis de las células β y a la claudicación de los islotes (Allen et al., 2005). En los últimos años se han investigado diversos procesos celulares que intervienen en dicho deterioro, siendo la glucotoxicidad y el estrés oxidativo los mecanismos principales desencadenados por el exceso de glucosa. Ambos procesos se discuten en el apartado 1.4.2.

1.3.3.- Diabetes monogénicas

Las formas monogénicas de diabetes son debidas a mutaciones en un único gen y constituyen un porcentaje minoritario y relativamente mal caracterizado del total de pacientes diagnosticados de diabetes mellitus. La diabetes mellitus neonatal y la diabetes tipo MODY (*Maturity onset diabetes of the young*) son los dos tipos principales de diabetes monogénicas, y se producen como consecuencia de un defecto primario en la función de las células β (Hattersley and Patel, 2017, Pearson et al., 2006).

La diabetes mellitus neonatal se define por su diagnóstico temprano, antes de los 6 meses de vida. La mayor parte de los afectados en Europa por esta enfermedad tienen mutaciones en los genes de dos subunidades del canal de K⁺ dependiente de

ATP (KCNJ11 y ABCC8) (Pearson et al., 2006), implicados en la liberación de insulina. También se han descrito mutaciones en el propio gen de la insulina (INS) (Garin et al., 2010, Colombo et al., 2008)

La diabetes tipo MODY constituye el tipo mayoritario de diabetes monogénicas. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante, inicio entre los 25-35 años, peso normal, disfunción de la célula β y ausencia de marcadores de autoinmunidad característicos de la diabetes tipo I. Actualmente se conocen 13 genes afectados por mutaciones puntuales que son los responsables de los distintos subtipos de diabetes tipo MODY (Bonnet et al., 2012).

Tabla 1- Tipos de diabetes mellitus MODY según el gen afectado

TIPO MODY	GEN	FUNCIÓN
MODY 1	HNF4 α	Factor de transcripción
MODY 2	GCK	Enzima
MODY 3	HNF1 α	Factor de transcripción
MODY 4	PDX1	Factor de transcripción
MODY 5	HNF1 β	Factor de transcripción
MODY 6	NEUROD1	Factor de transcripción
MODY 7	KLF11	Factor de transcripción
MODY 8	CEL	Enzima
MODY 9	PAX4	Factor de transcripción
MODY 10	INS	Hormona
MODY 11	BLK	Enzima
MODY 12	ABCC8	Receptor celular
MODY 13	KCNJ11	Canal de potasio

Clínicamente, la diabetes tipo MODY puede diagnosticarse erróneamente como tipo I o tipo II, de ahí que sea difícil establecer con precisión la incidencia real en la población de este tipo de diabetes. El diagnóstico molecular es esencial para un correcto diagnóstico y para la elección de un tratamiento adecuado. La mayor parte de los genes cuyas mutaciones producen diabetes tipo MODY codifican factores de transcripción que intervienen en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de las células β (Frayling et al., 2001), aunque una de las MODY más frecuentes (entre el 10%-60% de los casos) se produce como consecuencia de mutaciones en el gen de la glucoquinasa, enzima implicada en el metabolismo de la glucosa en el interior de las células β (Bishay and Greenfield, 2016)

1.4.- Especies reactivas de oxígeno y metabolismo

En el año 1954 se publicaron dos artículos que establecieron la existencia de radicales libres en los sistemas biológicos {Gerschman, 1954 #324;Commoner, 1954 #321}, sentando las bases de los numerosos trabajos que se sucedieron en las décadas siguientes describiendo el “entorno redox” celular. Las adaptaciones que presentan los organismos, no sólo para la coexistencia con estas especies químicas, sino su empleo como mediadores en procesos fisiológicos, hace que la investigación en este campo haya experimentado un gran auge.

ROS (*reactive oxygen species*) es un término ampliamente usado en la literatura científica que incluye radicales de oxígeno y algunos compuestos no radicales pero que son agentes oxidantes y/o se pueden transformar rápidamente en radicales (por ejemplo, el peróxido de hidrógeno, H_2O_2). Todos los radicales de oxígeno están considerados, junto con otros tipos de moléculas, especies reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de nitrógeno, RNS (*reactive nitrogen species*) incluyen igualmente radicales y moléculas no radicales (por ejemplo el peroxinitrilo, $ONOO^-$).

Las especies reactivas de oxígeno son productos del propio metabolismo celular. Uno de los principales mecanismos que provocan la formación de especies reactivas de oxígeno es la respiración aeróbica llevada a cabo en la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Durante la transferencia de energía, algunos electrones provenientes de NADH y $FADH_2$ abandonan el sistema y reaccionan con el oxígeno formando superóxido (Figura 3). El porcentaje de

electrones que no contribuyen a la reducción del oxígeno para formar agua es muy pequeño, 1-3% (Valko et al., 2007), y por el contrario contribuyen a la formación de superóxido. Los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones son los sitios donde se forma superóxido, que mayoritariamente se queda en la matriz mitocondrial y sólo un pequeño porcentaje sale al espacio intermembranal mitocondrial a través del complejo III.

Aunque las reacciones entre moléculas con un solo electrón desapareado sean las más frecuentes, en la mitocondria también se produce la reducción directa del oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno (Giorgio et al., 2005).

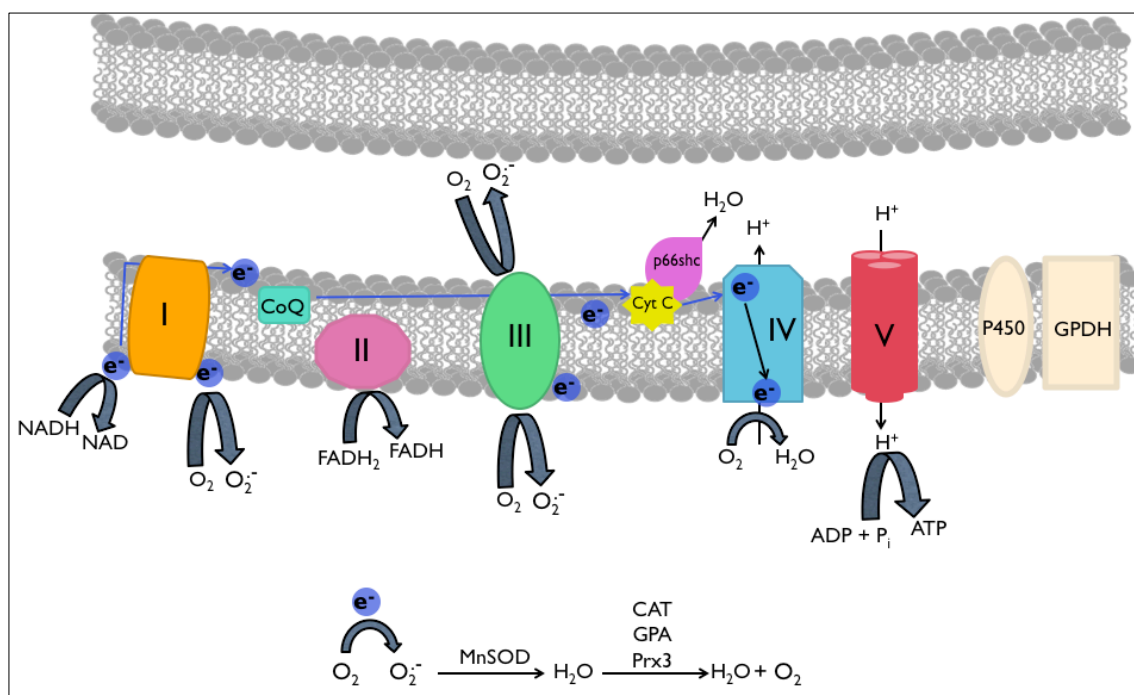


Figura 3- Producción de ROS en la cadena de transporte mitocondrial. Complejo I: complejo NADH deshidrogenasa. Complejo II: Ubiquinol deshidrogenasa. Complejo III: Citocromo reductasa. Complejo IV: Citocromo c-oxidasa. Complejo V: ATP sintasa

Otra fuente de especies reactivas de oxígeno proviene de la familia de enzimas que usan NADPH como sustrato. Existen siete miembros descritos (Nox1-5 y Duox1-2) y su función principal es regular la formación de especies reactivas de oxígeno. Las enzimas NADPH oxidasas se expresan en la mayoría de tipos celulares y están altamente conservadas en la evolución.

Además de la formación de superóxido en la mitocondria y de las enzimas NADPH oxidasas, existen otras vías de producción de especies reactivas que se

relacionan con compuestos oxidantes presentes en la célula. Estas vías están relacionadas con la actividad de las ciclooxigenasas, las enzimas del citocromo p450 o las lipooxigenasas (Zangar et al., 2004)

Las especies reactivas de oxígeno están directamente implicadas en el daño celular pero a su vez, tienen un papel crucial en la señalización intracelular y en otras funciones fisiológicas (Finkel, 2011). Entre los mecanismos de señalización celular mediados por estas moléculas, la fosorilación reversible de residuos de tirosina en las proteínas es uno de los eventos mas estudiados. Esta reacción está catalizada por la acción conjunta de enzimas tirosin-quinasas y tirosin-fosofatasas (PTPs), representando un sistema de control fundamental para la fisiología celular. Las proteínas PTP1B y PTEN pertenecen a esta última categoría y regulan la sensibilidad a insulina y la homeostásis glucémica in vivo (Loh et al., 2009). Ambas son oxidadas de forma transitoria por H_2O_2 en respuesta a insulina en líneas celulares, promoviendo la activación del receptor de insulina y la ruta del fosfoinositol 3-quinasa (Meng et al., 2004).

Además de participar en la transmisión de señales metabólicas, las especies reactivas de oxígeno actúan como “agentes” biocidas para los neutrófilos, principales células fagocíticas. La acumulación de H_2O_2 les permite dañar los componentes celulares además de actuar como transmisores de señales extracelulares en un proceso conocido como estallido respiratorio (*respiratory burst*) (Iles and Forman, 2002)

La secreción de insulina en respuesta a glucosa está mediada por un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (Leloup et al., 2009, Pi et al., 2007). Sin embargo, un exceso en la producción de radicales libres en las células de los islotes pancreáticos se ha asociado a la generación de la diabetes como un importante factor etiopatogénico.

1.4.1 Estrés oxidativo y patología diabética.

Todas las formas de diabetes se caracterizan por hiperglucemia, fallo variable en la acción de la insulina y el desarrollo de lesiones específicas de la diabetes en la retina, en el glomérulo renal y en los nervios periféricos. La diabetes además se asocia con el desarrollo temprano de arterioesclerosis en el corazón, cerebro y extremidades

inferiores. La mayor complicación de esta enfermedad es la cardiomiopatía.

La hiperglucemia causa daño tisular a través de 5 mecanismos principalmente (Giacco and Brownlee, 2010): (i) incremento en el flujo de glucosa y otros azúcares a través de la ruta del sorbitol; (ii) aumento en la formación de productos de glicosilación avanzada (AGEs, *advance glycation ends products*), así como de su rector y sus ligandos efectores; (iii) activación de las isoformas de la proteína kinasa C (PKC); (iv) incremento de la ruta de las hexosaminas. Tal como refleja la figura 4, estos mecanismos de daño tisular tienen en común que son activados bajo un mismo evento: la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Brownlee, 2005).

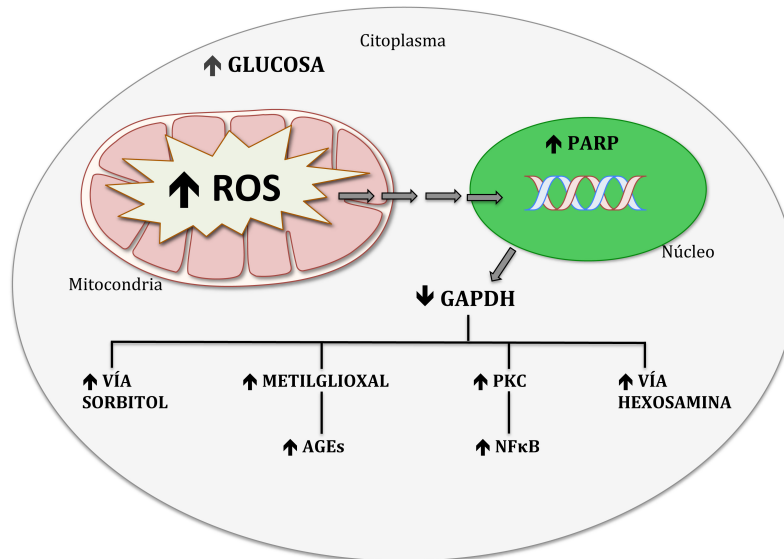


Figura 4- Esquema de los mecanismos de daño tisular en el entorno hiperglucémico.

Un aumento prolongado en la concentración de glucosa produce en la célula β un continuo deterioro en la sensibilidad de los mecanismos responsables de la síntesis de insulina en respuesta a glucosa (Robertson, 2004). Se conoce que el defecto en la expresión del gen de insulina se acompaña de un descenso en la expresión y/o en la unión al DNA de factores de transcripción como PDX-1 (pancreatic and duodenal homeobox-1) y MafA. PDX-1 es fundamental para el desarrollo del páncreas, la diferenciación de la célula β y el mantenimiento de la célula β madura (Robertson et al., 2003), y MafA actúa como un potente inductor en la transcripción del gen de insulina (Guo et al., 2013).

El islote pancreático posee niveles muy bajos de enzimas antioxidantes debido a que los genes que las codifican se expresan débilmente. Por tanto, la actividad antioxidante en estas células es reducida (Robertson and Harmon, 2007). Las células β carecen de un mecanismo de defensa eficiente contra el estrés oxidativo, y en consecuencia son mas susceptibles de sufrir daños que desembocan en deterioro funcional y muerte en situaciones de hiperglucemia crónica (Acharya and Ghaskadbi, 2010).

Existen numerosas evidencias clínicas que relacionan la glucotoxicidad y el estrés oxidativo en el desarrollo de diabetes tipo II y en las complicaciones fisiopatológicas de la diabetes tipo I. Este hecho se puede corroborar con los niveles elevados de marcadores para estrés oxidativo que se observan en pacientes con diabetes tipo II como hidroperóxidos, oxidación de bases de DNA, peroxidación lipídica, ect.. La clara implicación del sistema primario de defensa antioxidante también está presente ya que el tratamiento con sulfonilureas restaura los niveles de glucosa en pacientes con diabetes mediante un incremento de glutatión en sangre (Robertson and Harmon, 2006).

1.5.- *Alx3*

Alx3 es un factor de transcripción de tipo homeodominio que pertenece a la familia *paired*. Uno de los subtipos de homeoproteínas *paired* esta caracterizado por la presencia de un dominio conservado localizado en el extremo carboxilo-terminal denominado OAR o dominio *aristaleless*. Este grupo incluye *Prx1* y *Prx2* (Gehring et al., 1994), *Alx3* (ten Berge et al., 1998) *Alx4* (Qu et al., 1998) y *Cart1* (también denominado *Alx1*) (Zhao et al., 1993) que están altamente relacionados tanto estructural como funcionalmente. Además del homeodominio y del dominio aristales, *Alx3* tiene otras regiones que regulan su actividad transcripcional caracterizadas por la elevada proporción de prolinas (Perez-Villamil et al., 2004).

Los genes de la familia *aristaleless* exhiben patrones de expresión superpuestos durante el desarrollo embrionario en el mesénquima craneal derivado de la creta neural, los arcos branquiales, el mesodermo lateral y el primordio de las extremidades. En embriones de ratón *Alx3* se expresa a partir del día 8 de gestación.

En este estadio también se localiza en la región próxima al primordio de la cola y en la membrana alantoidea (ten Berge et al., 1998).

Alx3 está implicado en el desarrollo de estructuras óseas craneofaciales. En humanos se han descrito mutaciones del gen *ALX3* como la causa de una displasia frontonasal de tipo 1 denominada frontorria, malformación congénita hereditaria de carácter recesivo caracterizada por un desarrollo facial anómalo (Twigg et al., 2009). Además se ha descrito una asociación genética entre *ALX3* y la aparición de hendidura palatina (Jugessur et al., 2009).

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que la deficiencia de *Alx3* en ratones causa defectos en el cierre del tubo neural craneal y en la fusión de las estructuras craneofaciales en la línea media con penetrancia incompleta (Lakhwani et al., 2010). Además, alrededor de un 12% de los ratones deficientes en *Alx3* presentan polidactilia (Vallejo, 2011). Un aspecto importante de estos estudios fue el hallazgo según el cual la expresión de *Alx3* es dependiente de la existencia de niveles adecuados de ácido fólico, un conocido factor protector de este tipo de malformaciones congénitas (Blom et al., 2006). Por tanto, los defectos del cierre del tubo neural debidos a la carencia de *Alx3* son resistentes a la acción protectora del ácido fólico, y de manera análoga, los defectos producidos por la carencia de ácido fólico se asocian a una inhibición de la expresión de *Alx3* (Lakhwani 2010).

En ratones adultos, los estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron la expresión de *Alx3* en los diferentes tipos de células que componen los islotes pancreáticos (Mirasierra and Vallejo, 2006). Este trabajo reveló la función reguladora de *Alx3* sobre el promotor de insulina que, junto con los factores de transcripción E47/Pan1 y Beta2/NeuroD, favorece su transcripción. Posteriormente se determinó que la expresión de *Alx3* en las células β de los islotes pancreáticos está en parte mediada por la actividad coordinada de los factores de transcripción Pdx1 y Usf1-2 sobre su promotor, dirigiendo su actividad transcripcional (Fernandez-Perez and Vallejo, 2014). El conocimiento de todos los efectores implicados en este nivel de regulación molecular cobra relevancia ya que se han caracterizado mutaciones en algunos de estos genes, como Pdx1, asociados a MODY o al desarrollo de diabetes tipo II.

Estudios realizados para investigar la función de *Alx3* en las células α revelaron que este factor de transcripción es importante para la regulación de la expresión de

glucagón en respuesta a las variaciones en la concentración de glucosa (Mirasierra and Vallejo, 2016). Se observó que un incremento en la concentración de glucosa estimula la síntesis de Alx3 en estas células α , lo cual promueve la interacción de este factor de transcripción con Pax6, un importante factor regulador de la expresión del gen de glucagón (Gosmain et al., 2007). De esta forma, Alx3 interfiere con la actividad transcripcional de Pax6, reduciendo así los niveles de expresión de glucagón (Mirasierra and Vallejo, 2016).

Todos estos datos indican que Alx3 es un factor importante en el mantenimiento de la homeostasis glucémica en el organismo. En efecto, estudios realizados en ratones deficientes en *Alx3* pusieron de manifiesto que la carencia de este factor de transcripción se acompaña de una ligera pero significativa hiperglucemia (Mirasierra et al., 2011). Estos ratones presentan un peso corporal similar al de los ratones silvestres, y se caracterizan por la presencia de un menor contenido de insulina en los islotes de Langerhans. Los mecanismos celulares de secreción de insulina en respuesta a glucosa no están alterados. En animales maduros (36-40 semanas) se observa cierto grado de resistencia a la insulina, acompañado de un incremento de apoptosis en el islote.

Recientemente se ha demostrado que la carencia de Alx3 incrementa el riesgo de malformaciones embrionarias en ratonas con diabetes gestacional. La ausencia de Alx3 provoca que la expresión de genes codificantes de enzimas antioxidantes en respuesta al entorno hiperglucémico no se produzca. Alx3 incrementa su expresión en respuesta a glucosa y además, estimula la transcripción de Foxo1, cuyo papel es determinante en la expresión de enzimas antioxidantes. Estos estudios realizados en embriones indican que la carencia de Alx3 incrementa la vulnerabilidad al daño celular producido por el estrés oxidativo, lo cual desencadena apoptosis (Lakhwani et al., 2010) y favorece la aparición de malformaciones congénitas (Garcia-Sanz et al., 2017).

En animales adultos, la carencia de Alx3 también se acompaña de apoptosis en los islotes pancreáticos. En base a estos estudios, en la presente tesis doctoral se investiga si el incremento de la vulnerabilidad celular debida a la falta de función de Alx3, aumenta la incidencia de alteraciones metabólicas a nivel sistémico.

OBJETIVOS

La hipótesis planteada en la presente tesis doctoral es que la expresión de *Alx3* está implicada en los mecanismos de control del estrés oxidativo y por lo tanto, es importante para la supervivencia celular.

Para evaluar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la importancia de la expresión de *Alx3* en la generación de especies reactivas de oxígeno en el islote pancreático.
2. Determinar si *Alx3* está implicado en la expresión de genes protectores de estrés oxidativo.
3. Determinar si la ausencia de *Alx3* constituye un factor de riesgo en la obesidad inducida mediante ingesta de dieta rica en grasa.
4. Determinar el papel de *Alx3* en los adipocitos maduros del tejido graso epididimal.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Animales de experimentación

Se emplearon ratones macho deficientes en *Alx3* o sus controles silvestres mantenidos en la cepa híbrida C57BL/6 x FVB/N. Los ratones *Alx3*^{-/-}, generados por recombinación homóloga, fueron proporcionados por el Dr. Frits Meijlink (Netherlands Institute of Developmental Biology, Utrecht, Holanda) (Beverdam et al., 2001). Se estabularon en habitaciones con temperatura controlada (22°C-24°C) y con ciclos alternativos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con libre acceso a la comida y la bebida.

3.1.1.-Genotipado

La identificación del genotipo de los ratones se realizó mediante PCR a partir de DNA genómico obtenido de una sección de la cola. Se utilizó el kit comercial REExtract-N-Amp™Tissue PCR kit (Sigma) con los siguientes oligonucleótidos como cebadores para la amplificación del DNA:

Tabla 2.- Oligonucleótidos

Nombre	Oligonucleótido directo (5'- 3')	Oligonucleótido inverso (3'- 5')
Alx3	GAGGCTCAAGAACAAGGAAGGA	CTAGGAGCAGGTCAGAGCAGGAAG
LacZ	TCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT	AGACCAACTGGTAATGGTAGCGAC

Las condiciones para la PCR fueron: 95°C durante 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 55°C (para *LacZ*) o 57°C (para *Alx3*) durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos y finalmente una incubación a 72°C durante 5 minutos.

3.1.2.-Dietas

Se empleó un pienso estándar (Safe-diets A04, Panlab) para alimentar a todos los ratones excepto en aquellos experimentos diseñados para comprobar la susceptibilidad a una dieta elevada en grasa. En este caso, se usó un pienso comercial con alto contenido en grasas (60%) (TD-06414, Harlan) cuya composición se refleja

en la Tabla 1.

Tabla 3- Composición nutritiva de las dietas experimentales

	Pienso estándar	Pienso 60% grasa
Proteínas	18%	18.4%
Carbohidratos	59.9%	21.3%
Grasas	4%	60%

En los experimentos diseñados para evaluar los efectos de una dieta rica en grasa se utilizaron cuatro grupos de ratones de tres semanas de edad distribuidos de la siguiente forma:

- A) Dieta estándar: 10 ratones Alx3^{+/+} y 10 ratones Alx3^{-/-}
 B) Dieta grasa: 10 ratones Alx3^{+/+} y 10 ratones Alx3^{-/-}

Estas dietas se mantuvieron ininterrumpidamente durante un periodo 3 meses. El peso de los animales se monitorizó semanalmente desde el inicio de la dieta (t0)

3.1.3.-Determinación de la glucemia

Los niveles de glucosa se determinaron a partir de una muestra de sangre obtenida mediante punción en la cola tras un ayuno de 16 horas usando para ello un glucómetro comercial (Roche).

El test de tolerancia a la glucosa (GTT, *glucose tolerance test*) se realizó en el primer y tercer mes de la dieta. Para ello, después de la medición de los niveles basales, se administró una inyección de glucosa (2 g/kg, intraperitoneal) y se determinó de nuevo la glucemia transcurridos 15, 60 y 120 minutos desde la inyección.

3.1.4.-Determinación de la tolerancia a la insulina

De forma paralela, se realizaron test de tolerancia a la insulina (ITT, *insulin tolerance test*). Antes de la prueba se sometió a los animales a un ayuno de 4 horas.

Tras determinar los niveles basales de glucosa se inyectó intraperitonealmente insulina (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaert, Denmark) a una dosis de 0.75 U/kg, y se determinó de nuevo la glucemia transcurridos 15, 30, 60, 90, 120 minutos desde la administración de insulina.

3.2.- Aislamiento de islotes de Langerhans

El aislamiento y purificación de los islotes se realizó mediante digestión enzimática con collagenasa NB 8 de *Clostridium histolyticum* (Serva).

Para cada ratón se utilizó una solución de 2 mg de collagenasa en 5 ml de solución salina tamponada de Hank (*HBSS, Hank's balance salt solution*) que contenía Hepes (10 mM) y carecía de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Gibco).

Los animales son sacrificados mediante decapitación. Para proceder a la digestión del páncreas exocrino se colocó al animal en decúbito supino y se limpia la piel con etanol al 70%. Se realiza una incisión ventral y se retira la piel para acceder a la cavidad abdominal. El paquete intestinal se coloca hacia el lado izquierdo del animal y se localiza la ampolla de Vater, también conocida como ampolla hepatopancreática, formada por la unión del conducto pancreático y el conducto biliar común. La ampolla se encuentra específicamente en la papila duodenal mayor. Se clampa a ambos lados para bloquear el paso biliar al duodeno. Se carga una jeringuilla con una aguja de 30G $\frac{1}{2}$ " con 3 ml de la solución de aislamiento. La aguja se inserta en el sitio de unión entre el conducto hepático y el conducto cístico. A continuación se inyecta la solución con un flujo lento y constante. El páncreas aumenta su volumen y se vuelve traslúcido, lo que sirve como indicador de buena práctica. En este momento el páncreas se diseca rápidamente y tras eliminar los restos de grasa y de tejido conectivo, lo depositamos en un tubo con 2 ml de solución de aislamiento en hielo. A continuación, para facilitar la digestión enzimática, se incubó en un baño con agitación a 37°C durante 20 minutos. Una vez que el tejido se ha disuelto en partículas pequeñas, la reacción se detuvo poniendo las muestras de nuevo en hielo y añadiendo una solución de lavado HBSS-BSA 0.5% (*Bovine Serum Albumin*). Se realizan 3 lavados seriados, dejando que los islotes sedimentaran y se eliminaran los restos de tejido exocrino y grasa. Por último, bajo una lupa esteroscópica (Leica) se recogen manualmente los islotes con una pipeta P20 con la punta abierta para evitar daños mecánicos. Los islotes se mantienen

en cultivo al menos 16 horas en medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con glucosa (5.6 mM), FBS (*Fetal Bovine Serum*) al 10%, 0.25% Hepes, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina.

3.3.- Medición de ROS en islotes de Langerhans

Tras su cultivo durante 16 horas tal como se describe en el epígrafe anterior, los islotes pancreáticos aislados se trataron durante una hora con glucosa (5.6 o 25 mM) en ausencia o presencia de palmitato (600 µM). Al final de esta hora, con el fin de determinar el contenido de ROS, los islotes se incubaron con la sonda CM-H₂DCFDA a una concentración de 10 µM, en medio carente de suero, a 37°C, 5% CO₂, en oscuridad durante 1 hora. Seguidamente se lavaron dos veces en medio completo y se depositaron en una placa adaptada para microscopía in vivo (IBIDI) con el medio correspondiente a cada condición.

La producción de especies reactivas de oxígeno se determinó mediante medición de la fluorescencia emitida por un derivado de CM-H₂DCFDA generado en el interior de las células utilizando microscopía confocal. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal espectral LSM710 (Zeiss), con un objetivo Plan-APOCHROMAT 25x, de apertura numérica 0.8. Se tomaron aproximadamente 10 planos a lo largo del eje Z del islote, con una separación de 1.4 µm entre ellos, con un zoom de 0.7x. El láser de emisión es de 488 nm y la ventana de detección de 493-652 nm. En paralelo se obtuvieron imágenes de contraste de interferencia diferencial Nomarski para delimitar el perfil del islote. La composición de la proyección total de las imágenes se llevó a cabo con el programa informático Zen 2009 (Leica). Esta composición sumatoria de todos los planos recoge la fluorescencia total emitida por la sonda. Mediante el programa de análisis de imagen NIH ImageJ 1.47v se substrajo el fondo no específico y se cuantificó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

3.4.-Extracción y fijación del páncreas para histología

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación. Se retiró el páncreas de la cavidad abdominal, se anotó el peso y se fijó durante 16 horas en paraformaldehído (Sigma) al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4, a 4°C.

Posteriormente fueron crioprotegidos en sacarosa (Sigma) al 30% a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.4.1- Inmunohistoquímica

Una vez fijados, las muestras de páncreas se embebieron en resina TissueTek OCT (Sakura) y se congelaron a -20°C, tras lo cual las muestras se procesaron en un criostato Leica Cryocut 1950 para generar secciones de 10 µm de grosor. Las secciones se montaron y se conservaron a -20°C en portaobjetos de cristal tratados electrostáticamente.

Primeramente, los cortes histológicos obtenidos se lavaron 3 veces (10 minutos cada vez) con PBS-tritón 0.2% para eliminar los restos de resina TissueTek OCT y, a continuación, se permeabilizaron con metanol frío (-20°C) durante 5 minutos. El siguiente paso fue bloquear las posibles uniones inespecíficas con suero normal de cabra (10%). Una vez bloqueado, se incubaron 16 horas, a 4°C, con el anticuerpo anti-nitrotirosina (Millipore). Transcurrido este tiempo, se realizaron varios lavados con PBS-Tritón 0.2% y se bloqueó la enzima peroxidasa endógena del tejido con una dilución al 0.1% de H₂O₂ en PBS durante 30 minutos. Se lavaron de nuevo y se incubaron durante 1 hora con el correspondiente anticuerpo secundario conjugados con biotina (Laboratorios Vector), a una dilución 1:500. Los lavados sucesivos se realizaron en PBS sin tritón, y se procedió a la incubación durante 45 minutos a temperatura ambiente con el complejo ABC (Vectastain Elite Kit, Vector) diluido según las especificaciones del fabricante. El revelado de la reacción se llevó a cabo mediante la utilización de diaminobencina (DAB) (Laboratorios Vector), para lo cual las secciones se incubaron durante unos minutos en una solución de tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobenzina al 0.03% y H₂O₂ al 0.01% (v/v) en PBS. Las muestras se montaron con DePeX (Serva) y se analizaron en un microscopio óptico provisto con una cámara digital.

3.4.2. Estudio morfométrico del páncreas

Se analizaron secciones histológicas criopreservadas de 10 µm de grosor teñidas levemente con violeta de cresilo para resaltar los islotes sobre el tejido

exocrino. Se fotografiaron en un microscopio óptico secciones separadas al menos 80 μm de la anterior, cubriendo de esta forma la totalidad del páncreas. El número de islotes presentes en cada sección, así como el área ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$) correspondiente a cada uno de ellos, se analizó usando el software NIH ImageJ 1.47v

3.5.-RT-PCR cuantitativa en islotes pancreáticos de ratón.

La expresión de genes que codifican enzimas eliminadoras de radicales libres se estudió mediante RT-PCR cuantitativa. Las determinaciones por RT-PCR cuantitativa se realizaron en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid a partir del RNA obtenido de islotes pancreáticos de ratón mediante TRIZOL. La expresión de genes se monitorizó utilizando un método de detección con SYBR Green. El ensayo se llevó a cabo en una solución Power SYBR Green master Mix (Applied Biosystems) con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 2, usando un equipo ABI7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Los experimentos se realizaron al menos por triplicado y los valores obtenidos se normalizaron frente a los niveles de mRNA de GAPDH.

Tabla 5.- Oligonucleótidos diseñados para RT-PCR cuantitativa (SYBR Green)

Gen	Oligonucleótido directo (5'-3')	Oligonucleótido inverso (3'-5')
m-GPX-1	CCTCAAGTACGTCCGACCTG	CAATGTCGTTGCGGCACACC
m-MnSOD	GCACATTAACGCGCAGATCA	AGCCTCCAGCAACTCTCCTT
m-Catalasa	GCAGATACCTGTGAACTGTC	GTAGAATGTCCGCACCTGAG
m-Nrf2	TCACACGAGATGAGCTTAGGGCAA	TACAGTTCTGGGCGGCGACTTTAT
m-Ucp2	CAGCCAGCGCCCAGTACC	CAATGCGGACGGAGGCAAAGC

3.6. Determinación del tamaño medio de los adipocitos.

Para la determinación del tamaño medio de los adipocitos se extrajeron muestras de tejido adiposo epididimal. Tras 16 horas de fijación a 4°C en solución de paraformaldehído al 4%, se mantuvieron en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina. Posteriormente, se obtuvieron secciones seriadas de 5 micras de grosor y se tiñeron con hematoxilina.

Las imágenes digitales se obtuvieron en un microscopio Axiophot (Zeiss) con un aumento de 20x y resolución máxima (2040 x 1536 pixeles). Se fotografiaron 5 secciones distintas de cada animal, con un mínimo de 3 ratones por genotipo.

Las imágenes fueron analizadas mediante el software libre Adiposoft (Galarraga et al., 2012). Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante la distribución de Pearson (χ^2).

3.7.-Determinación del contenido de triglicéridos hepáticos.

La concentración de triglicéridos hepáticos se obtuvo siguiendo el protocolo adaptado de Folch (Folch et al., 1957). Se utilizaron 50 mg de hígado que fueron homogeneizados mediante disrupción mecánica con la ayuda de un polytron. A continuación se realizó una extracción en cloroformo:metanol del contenido lipídico. Finalmente, se determinaron los niveles de triglicéridos mediante espectrofotometría siguiendo las indicaciones del kit comercial Triglycerides (BioSystems).

3.8.-Determinación de los niveles de triglicéridos circulantes.

La concentración de triglicéridos en plasma se determinó mediante un ensayo espectrofotométrico siguiendo las especificaciones del kit comercial Triglycerides (BioSystems).

3.9.-Determinación de los niveles de peroxidación lipídica.

Los niveles de peroxidación lipídica en islotes pancreáticos aislados fueron determinados mediante la detección de malondialdehído (MDA). 200 μ l de cada homogenado de islotes pancreáticos se incubaron a 45°C con el cromógeno N-methyl-2-fenolindol en presencia de HCl al 37% durante 60 minutos. La aparición de un color azul indica la presencia de productos peroxidados. La concentración de lípidos peroxidados es directamente proporcional a la concentración del cromóforo, y por tanto a la intensidad del color. Las cantidades de MDA fueron determinadas por espectrofotometría a 586 nm y los valores calculados por interpolación en una curva estándar de MDA con 1,1,3,3-tetrametoxipropano. Los resultados fueron calculados

como nmol de MDA corregidos por mg de proteína.

3.10.-Determinación de los niveles de leptina.

Los niveles de leptina se determinaron a partir de su concentración en el plasma utilizando el kit comercial Mouse Leptin Elisa Kit (Crystal Chemicon Inc).

4.-RESULTADOS

4.1.- *Alx3* y estrés oxidativo en islotes pancreáticos.

4.1.1.- La carencia de *Alx3* provoca estrés oxidativo en los islotes pancreáticos.

El incremento de la apoptosis tanto en células de los islotes pancreáticos adultos (Mirasierra et al., 2011) como en el mesénquima embrionario del primordio craneofacial de ratones carentes de *Alx3* (Lakhwani et al., 2010), así como el papel de *Alx3* como pieza fundamental en los mecanismos de defensa contra estrés oxidativo inducido por hiperglucemia (Garcia-Sanz et al., 2017) nos llevaron a plantear la hipótesis según la cual el observado incremento de muerte celular y reducción de la masa de células beta en los islotes de los animales carentes de *Alx3* podría deberse a un exceso de producción de radicales libres. Para evaluar esta hipótesis se aislaron islotes pancreáticos tanto de ratones silvestres y como deficientes en *Alx3* según el método modificado previamente descrito por nuestro laboratorio (Mirasierra et al., 2011) y se incubaron en presencia de la sonda CM-H₂DCFDA en un medio con diferentes concentraciones de glucosa.

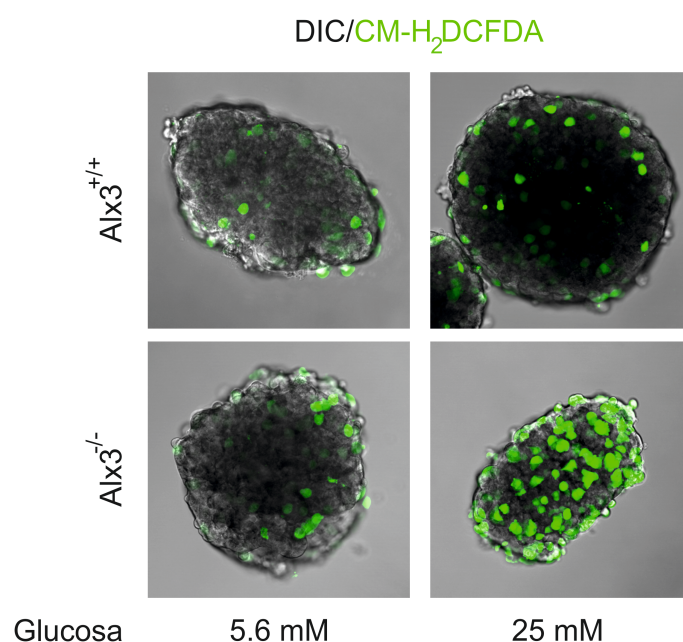


Figura 5- Determinación de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos. Imágenes tomadas mediante microscopia confocal (verde) superpuestas sobre imágenes tomadas mediante microscopía de contraste de fase, representativas de los islotes de ratones *Alx3*^{+/+} y *Alx3*^{-/-} cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa e incubados con la sonda fluorescente CM-H₂DCFDA.

La fluorescencia emitida por los islotes indicó que, a concentraciones de glucosa equivalentes a las fisiológicas, (5.6 mM), no existen diferencias significativas entre los islotes de ambos genotipos en la producción de especies reactivas de oxígeno (Figura 5), mientras que en presencia de una concentración elevada de glucosa, (25 mM), los niveles fueron significativamente mayores en los islotes carentes de Alx3. Los resultados obtenidos se muestran cuantitativamente en la Figura 6.

La adición palmitato (600 μ M) en presencia de una concentración de glucosa de 5.6 mM indujo un aumento de especies reactivas de oxígeno en los islotes carentes de Alx3 pero no en los controles. Sin embargo, en presencia de la mayor concentración de glucosa la adición de palmitato no produjo un efecto adicional (Figura 6).

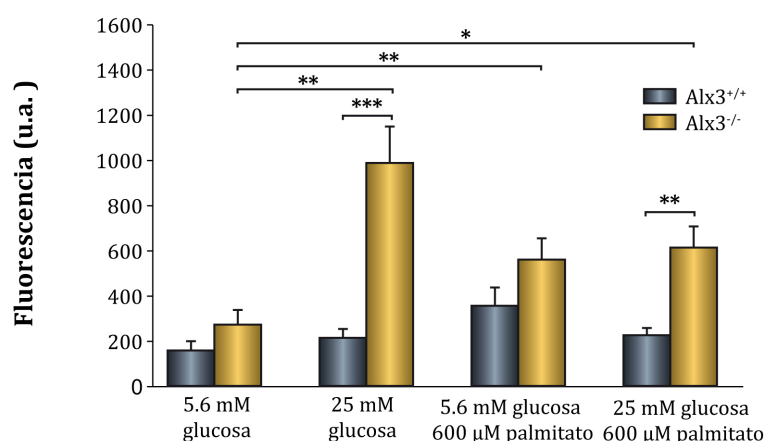


Figura 6.- Determinación de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos. Respuesta oxidativa de los islotes a concentraciones de 5.6 mM y 25 mM de glucosa y/o 600 μ M de palmitato tras 1 hora de estímulo. n=15-26 islotes por condición. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda CM-H₂DCFDA (u.a., unidades arbitrarias). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (Test de la t de Student)

A continuación se evaluó la producción de especies reactivas de oxígeno tras una incubación de 48 horas en las de glucosa y palmitato. Los islotes Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-} mantenidos en concentraciones equivalentes a la normoglucemia no presentaron diferencias en la producción de especies reactivas de oxígeno. La incubación en una concentración de 25 mM de glucosa produjo un aumento significativo de fluorescencia solo en los islotes carentes de Alx3, lo cual sugiere la puesta en marcha de mecanismos compensatorios en los islotes control que no se activan en ausencia de Alx3 (Figura 7). La presencia de palmitato (5.6 mM glucosa) no afectó a los islotes de ninguno de los dos genotipos ni produjo un efecto adicional (Figura 7). La

combinación de palmitato con glucosa 25 mM si que indujo la producción de especies reactivas en los islotes deficientes en Alx3.

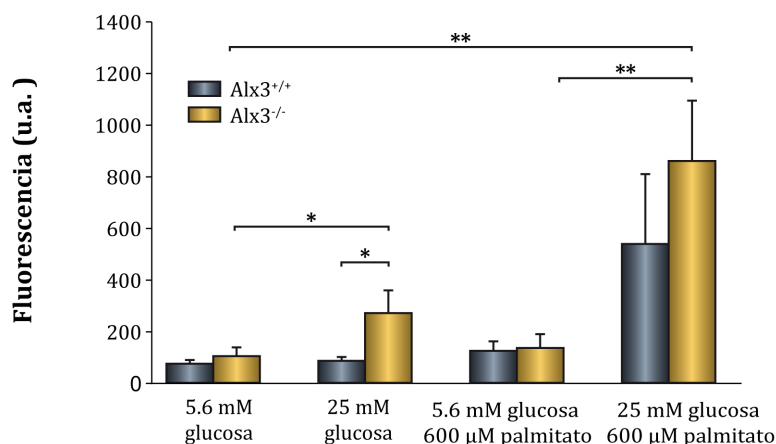


Figura 7-Determinación de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos. Respuesta oxidativa de los islotes a concentraciones de 5.6 mM y 25 mM de glucosa y/o 600 μ M de palmitato tras 48 horas de estímulo. n=15 islotes por condición. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda CM-H₂DCFDA (u.a., unidades arbitrarias). *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 (Test de la t de Student)

4.1.2.- Alx3 y metabolismo mitocondrial

La presencia de especies reactivas de oxígeno y la elevación en los niveles de ATP derivados del metabolismo mitocondrial son dos fenómenos asociados con la secreción de insulina en respuesta a glucosa (Meng et al., 2004). Por ello quisimos determinar si la deficiencia de Alx3 aumenta la vulnerabilidad mitocondrial a los efectos tóxicos de la antimicina A, un inhibidor de la cadena respiratoria.

La fluorescencia derivada de la producción de especies reactivas de oxígeno cuando los islotes de ratones Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-} se pretrataron durante 1 hora en presencia de antimicina A aumentó de una manera dependiente de la concentración en ambos genotipos. Sin embargo, en los islotes deficientes en Alx3 este aumento fue significativamente mayor que en los controles (Figura 8).

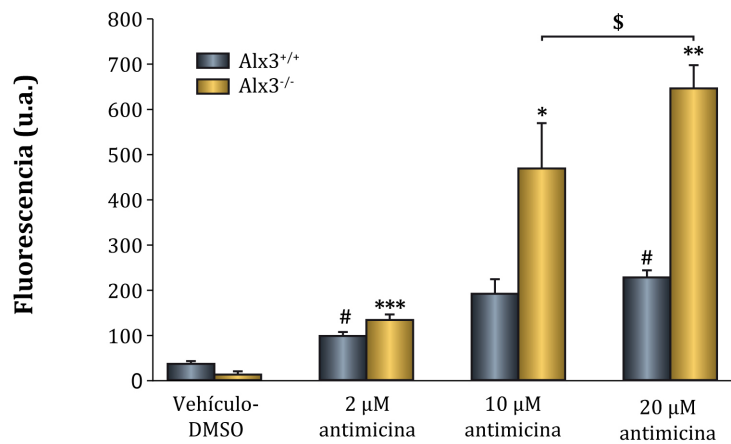


Figura 8- La deficiencia de Alx3 aumenta la toxicidad de la antimicina A. Dosis-respuesta frente a distintas concentraciones (2 μ M, 10 μ M, 20 μ M) de antimicina A, inhibidor del complejo III de la cadena de transporte mitocondrial. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda CM-H₂DCFDA (u.a., unidades arbitrarias). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ con respecto al vehículo-DMSO Alx3^{-/-}. # $p \leq 0.05$ con respecto al vehículo-DMSO Alx3^{+/+} (Test de la t de Student)

Un factor que desempeña un papel fundamental en el control del metabolismo mitocondrial y cuya deficiencia genera un exceso en la producción de radicales libres que da lugar a estrés oxidativo persistente es Ucp2 (Allen et al., 2005, Pi et al., 2009). Para determinar si el observado aumento de estrés oxidativo producido por la carencia de Alx3 se debe a una disminución de los niveles de Ucp2, determinamos su expresión mediante PCR cuantitativa. Los resultados muestran que no se detectaron cambios significativos en su expresión en los islotes de ninguno de los dos genotipos cultivados en baja o alta concentración de glucosa (Figura 9).

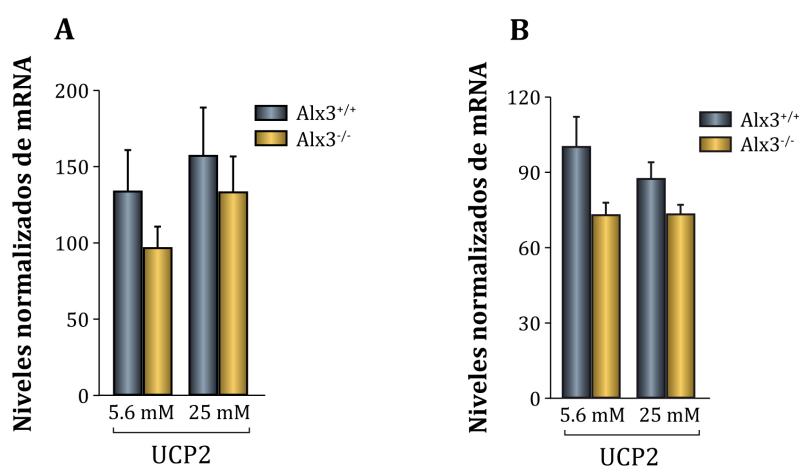


Figura 9- La deficiencia de Alx3 no altera la expresión de UCP2. Niveles relativos de mRNA de Ucp2 en islotes control y deficientes en Alx3 cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa durante 1 hora (A) y 48 horas (B). Por cada condición se usaron 10 animales.

4.1.3.- Presencia de marcadores de estrés oxidativo en el páncreas de ratones $Alx3^{-/-}$.

La propia naturaleza de las especies reactivas promueve su interacción con otras moléculas en el interior de las células como proteínas y lípidos, que se modifican covalentemente de manera permanente. Así, las especies reactivas de nitrógeno producen nitración de proteínas en residuos de tirosina, mientras que las de oxígeno producen peroxidación de lípidos.

Utilizando inmunohistoquímica en secciones de páncreas detectamos un aumento de la nitrotirosinación de proteínas en los islotes de los ratones carentes de $Alx3$ con respecto a los islotes de los ratones control (Figura 10). Las células inmunopositivas se observaron tanto en la periferia de los islotes como en el interior, sugiriendo que tanto las células α y δ como las células β se ven comprometidas. El marcaje celular es citoplasmático y no se observan núcleos positivos.

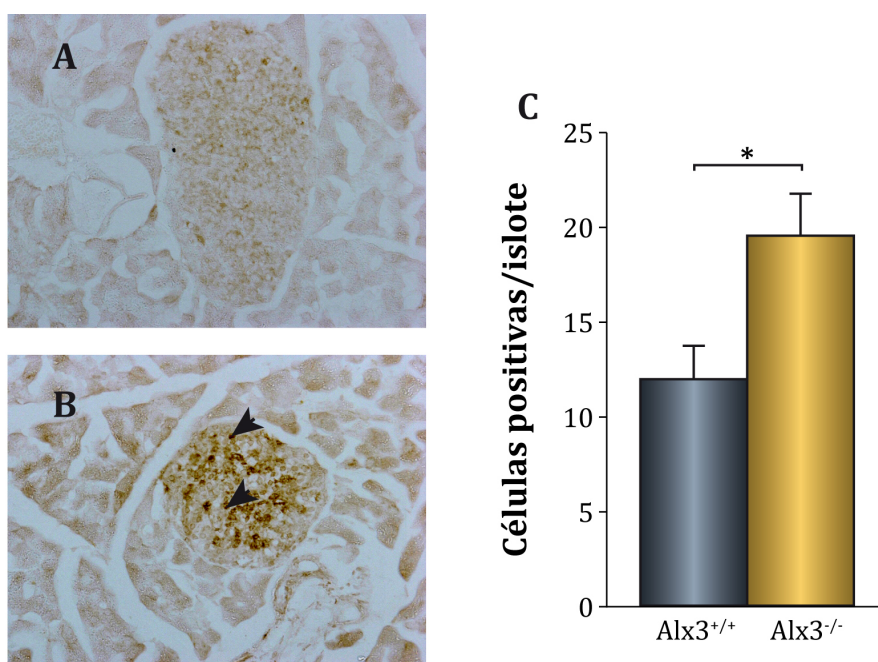


Figura 10- Detección de nitrotirosina mediante inmunohistoquímica. A y B) Imágenes representativas de islotes de un ratón control (A) y uno deficiente en $Alx3$ (B). Las cabezas de flecha indican ejemplos de células inmunopositivas para nitrotirosina. C) Cuantificación del número de células positivas en islotes similares a los mostrados en los paneles A y B. $*p \leq 0.05$ (test de la t de Student)

Para determinar si la carencia de $Alx3$ favorece la acumulación de productos derivados de la peroxidación lipídica, se analizó el contenido de MDA presente en

islotos pancreáticos mediante determinación bioquímica. Como se observa en la Figura 11, los islotes $Alx3^{-/-}$ presentaban niveles mayores de MDA, lo cual indica la presencia de estrés oxidativo.

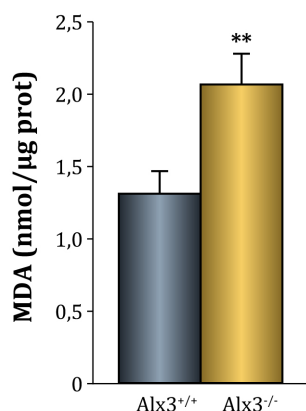


Figura 11- La deficiencia de $Alx3$ produce un aumento de la peroxidación de lípidos. Determinación bioquímica de la presencia de MDA (malondealdehído) como marcador de peroxidación lipídica en los islotes pancreáticos. $n=12$ animales por genotipo. $**p \leq 0.001$ (Test de la t de Student)

4.1.4.- Expresión de genes protectores de estrés oxidativo

La respuesta celular frente al estrés oxidativo provocado por hiperglucemia desencadena la expresión de enzimas antioxidantes encargadas del balance oxidativo de la célula. Por tanto, investigamos si esta respuesta se encuentra alterada en islotes deficientes en $Alx3$.

Primeramente, se analizó la expresión de los genes que codifican las enzimas catalasa, glutatión peroxidasa-1 y manganeso superóxido dismutasa frente a una concentración elevada de glucosa (25 mM). Tras una hora de incubación los niveles de mRNA para catalasa fueron prácticamente indetectables en islotes deficientes en $Alx3$, tanto en una concentración basal (5,6 mM) como elevada (25 mM) de glucosa, a diferencia de lo observado en los islotes control (Figura 12A). No se observaron diferencias significativas en la expresión de $Gpx1$ o $MnSOD$ (Figura 12A). Tras una incubación de 48 horas la expresión de los genes de catalasa, glutatión peroxidasa-1 y manganeso superóxido dismutasa en los islotes $ALX3^{-/-}$ fue significativamente menor que la observada en los islotes control (Figura 12B). Estos resultados sugieren que la carencia de $Alx3$ en los islotes pancreáticos se acompaña de un déficit en los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo.

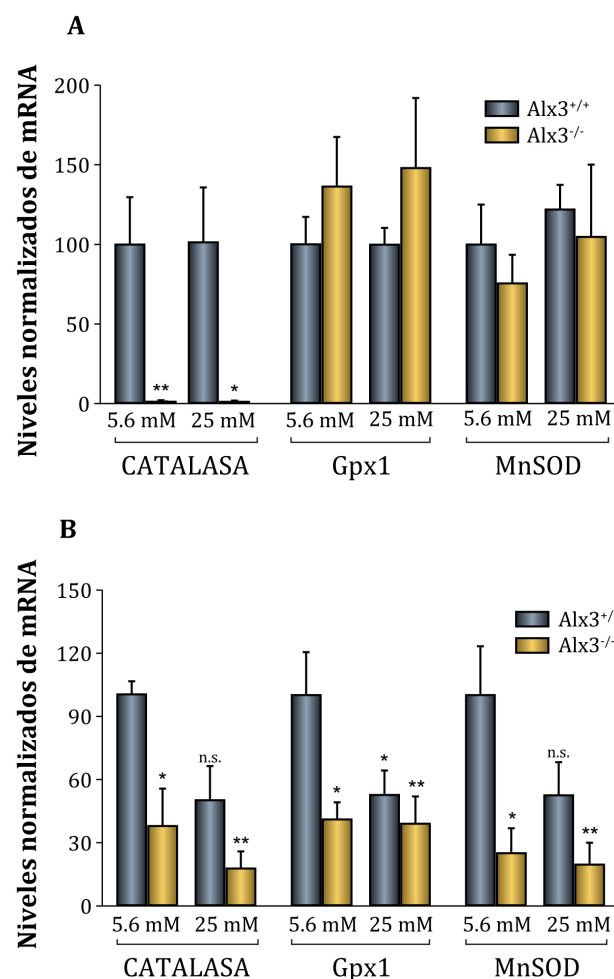


Figura 12- Expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes. Niveles relativos de mRNA de Catalasa, Gpx-1 y MnSOD en islotes control o deficientes en Alx3 cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa durante 1 hora (A) y 48 horas (B). Por cada condición se usaron 10 animales. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ con respecto a la condición Alx3^{+/+} 5.6 mM. (Test de la t de Student).

Estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio indican que Alx3 no regula directamente la expresión de los tres genes antioxidantes descritos en estos experimentos (Garcia-Sanz et al., 2017). Por tanto, procedimos a investigar si Alx3 regula la expresión de estos genes indirectamente, mediante la estimulación de la expresión de factores de transcripción que son fundamentales para la activación de la respuesta de defensa frente al estrés oxidativo. Entre ellos cabe destacar Nrf2 (Yagishita et al., 2014) y Foxo1 (Storz, 2011). Para analizar la expresión de los genes que codifican estos factores en el mismo contexto que las enzimas antioxidantes, es decir, de manera dependiente del tiempo de incubación y de la concentración de glucosa, se realizaron PCR cuantitativas. Los resultados indicaron que en estas

condiciones, los islotes $\text{Alx3}^{+/+}$ y $\text{Alx3}^{-/-}$ no presentan diferencias significativas en la expresión de Nrf2 o Foxo1 (Figura 13 y 14).

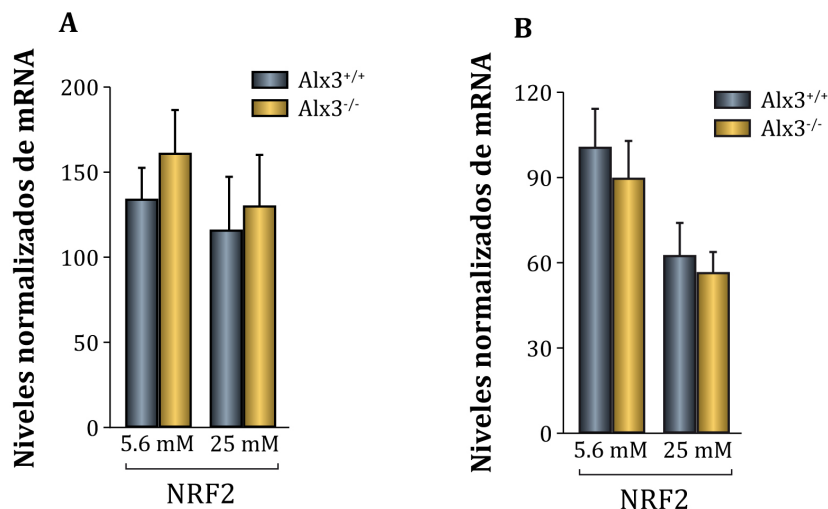


Figura 13- La carencia de Alx3 no altera la expresión de Nrf2. Niveles relativos de mRNA de NRF2 en islotes control o deficientes en Alx3 cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa durante 1 hora (A) o 48 horas (B). Por cada condición se usaron 10 animales.

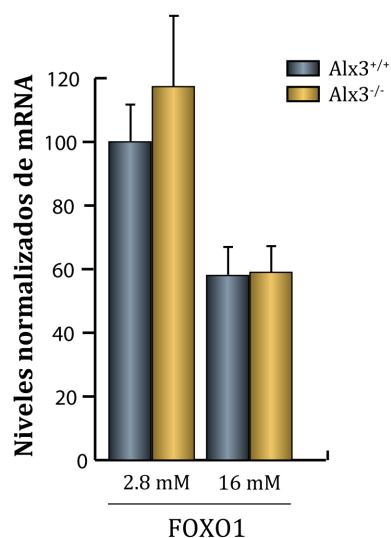


Figura 14- La carencia de Alx3 no altera la expresión de FoxO1. Niveles relativos de mRNA de FoxO1 en islotes control o deficientes en Alx3 cultivados en presencia de las concentraciones indicadas de glucosa durante 16 horas. Por cada condición se usaron 5 animales.

4.2.- Respuesta de los ratones deficientes en Alx3 a una dieta rica en contenido de grasa.

Los resultados descritos en el apartado anterior nos llevaron a proponer que los islotes pancreáticos deficientes en Alx3 podrían ser más vulnerables al daño celular producido por una sobrecarga metabólica. En la diabetes tipo 2, caracterizada

por la existencia de resistencia a la insulina frecuentemente asociada a obesidad, la respuesta continuada de las células beta mediante la hipersecreción de esta hormona como mecanismo compensador conduce a la claudicación de los islotes por muerte celular. Por tanto, evaluamos si la alimentación de ratones deficientes en *Alx3* con una dieta rica en grasas conduce a una claudicación prematura de los islotes con respecto a los ratones control.

Los ratones empleados en este experimento iniciaron la alimentación con una dieta hipercalórica (60% de grasa) con 4 semanas de vida tras ser destetados y con un peso medio de 12.93 ± 0.33 g. Se distribuyeron aleatoriamente en grupos alimentados con pienso estándar o con pienso rico en grasa. Se estudiaron los efectos sobre diversos aspectos de la biología de los islotes pancreáticos y se evaluaron diferentes parámetros metabólicos. Los resultados de estos experimentos se describen en los siguientes apartados.

4.2.1.- Incremento de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos de ratones sometidos a una dieta rica en grasas.

De manera análoga a lo descrito en el apartado 1.1, en islotes pancreáticos sometidos a la influencia de una concentración elevada de glucosa *in vitro*, evaluamos si la carencia de *Alx3* promueve la producción excesiva especies reactivas de oxígeno *in vivo* al ser expuestos a la sobrecarga metabólica que supone una alimentación con una dieta hipercalórica.

En animales alimentados con dieta estándar tras el destete durante tres meses, la carencia de *Alx3* produjo un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno en los islotes pancreáticos (Figura 15). Los islotes de ratones control sometidos a alimentación con una dieta hipercalórica durante el mismo periodo no mostraron diferencias significativas con respecto a los de los ratones alimentados con dieta estándar (Figura 15). Sin embargo, en los islotes de los ratones carentes de *Alx3* el incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno fue significativamente mayor que en los controles.

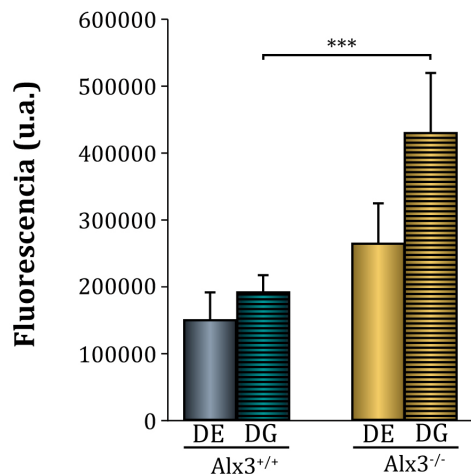


Figura 15-Determinación de especies reactivas de oxígeno en islotes pancreáticos. Respuesta oxidativa en islotes aislados de animales Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-} alimentados con dieta estándar (DE) o dieta rica en grasa (DG). n=15 islotes por condición. Cuantificación de la fluorescencia emitida por la sonda CM-H₂DCFDA (u.a., unidades arbitrarias). ***p≤0.001 (Test de la t de Student)

4.2.2.- La deficiencia en *Alx3* previene la hiperplasia de los islotes pancreáticos en respuesta a una dieta hipercalórica.

Los islotes de los ratones Alx3^{-/-} tienen un menor contenido en insulina y son más pequeños que los de los ratones Alx3^{+/+}, razón por la cual la masa de células β en estos animales se encuentra significativamente reducida (Mirasierra et al., 2011). En animales silvestres, la alimentación con una dieta rica en grasas produce una hiperplasia de los islotes pancreáticos para compensar la resistencia periférica a insulina que se traduce en un incremento del tamaño de los mismos (Laybutt et al., 2001). Por tanto, nos propusimos evaluar si esta respuesta compensatoria está alterada en los ratones deficientes en Alx3 alimentados con una dieta hipercalórica. La Figura 16 muestra cortes histológicos representativos utilizados para realizar los estudios morfométricos.

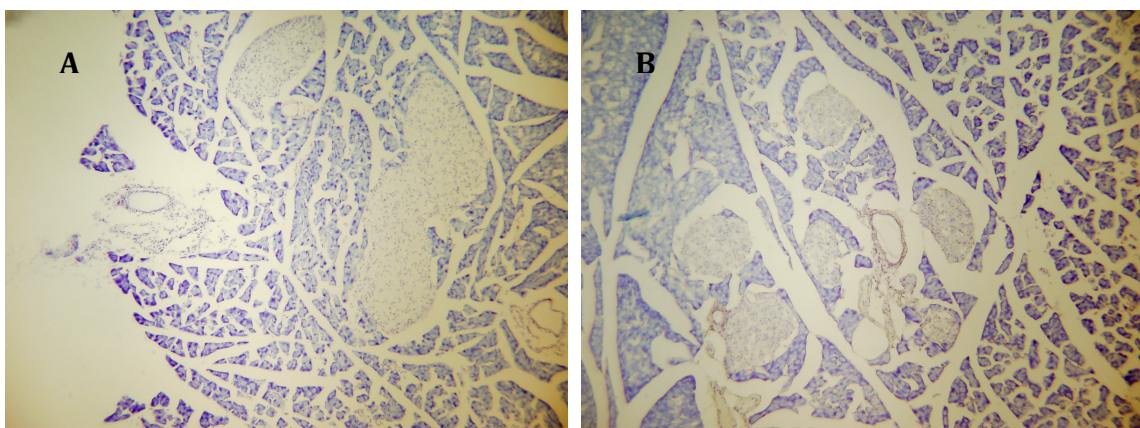


Figura 16- Determinación del tamaño del islote. Imágenes representativas de secciones de páncreas teñidas con violeta de cresilo. Los islotes Alx3^{+/+} (A) tienen un tamaño superior a los islotes Alx3^{-/-} (B).

Como era de esperar, observamos que los islotes de los ratones $Alx3^{+/+}$ alimentados con un pienso rico en grasas era mayor que el de los islotes de animales alimentados con dieta estándar (Figura 17A). Sin embargo, esta diferencia no se detectó en el caso de ratones deficientes en $Alx3$ (Figura 17A). Un análisis comparativo de la distribución de los tamaños de los islotes indicó que en los ratones control el aumento del tamaño medio de los islotes ocurre como consecuencia de la disminución del número de islotes pequeños ($< 14000 \mu m^2$) y el aumento de los de tamaño medio (entre 14000 y $56000 \mu m^2$) (Figura 17B).

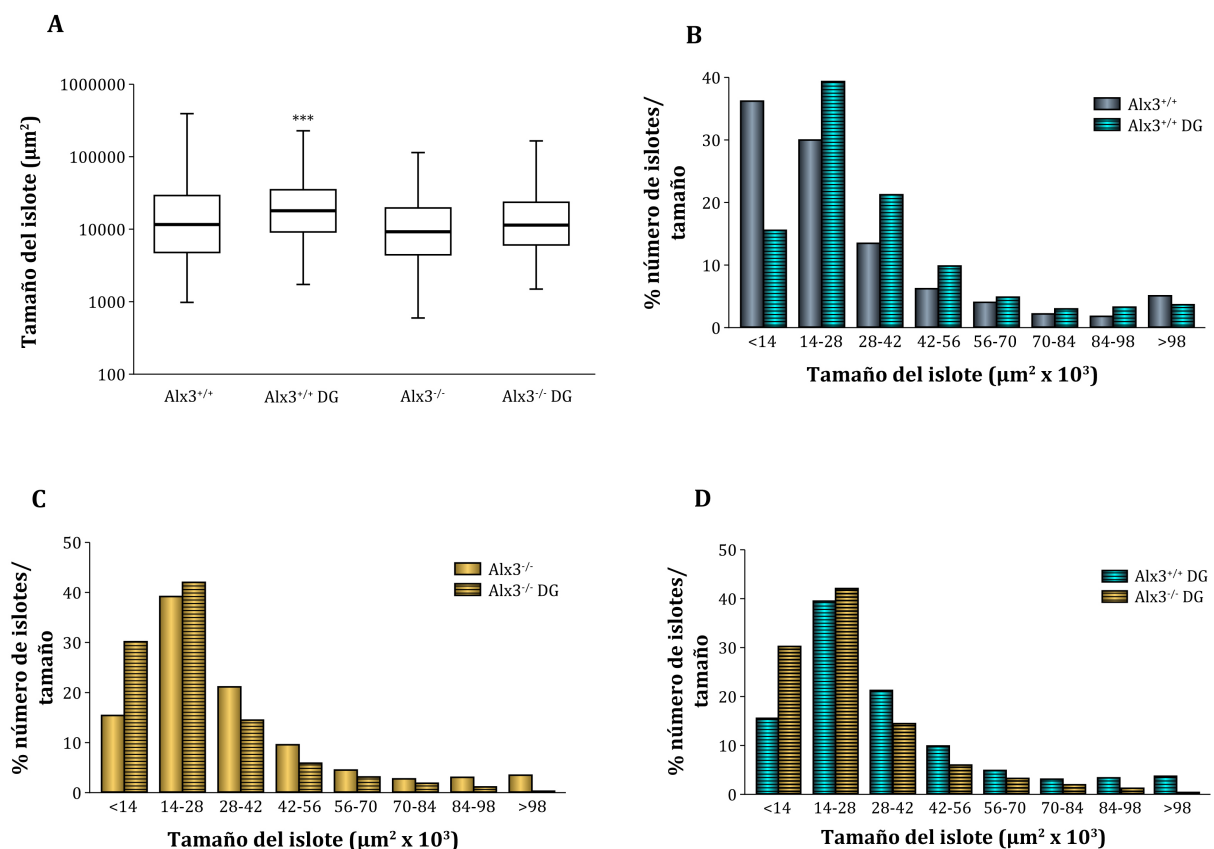


Figura 17.-Análisis morfométrico de los islotes pancreáticos A) Tamaño medio de los islotes en un gráfico “box-and-whisker”, donde se representa la mediana de los datos y los cuartiles primero y tercero. *** $p \leq 0.001$ (Test U de Mann-Whitney). B,C,D) Distribución del número de islotes según su tamaño. *** $p \leq 0.001$ $Alx3^{+/+}$ DG vs $Alx3^{-/-}$ DG, *** $p \leq 0.001$ $Alx3^{+/+}$ vs $Alx3^{+/+}$ DG (χ^2 test)

4.2.3.- El déficit de *Alx3* altera la ganancia de peso y la ingesta de ratones sometidos a dieta hipercalórica.

La monitorización de la ganancia de peso de los ratones durante los tres meses siguientes al destete indicó que cuando se alimentan con dieta estándar, no existen diferencias significativas entre los ratones deficientes en *Alx3* y los controles (Figura 18). Como era de esperar, los ratones control alimentados con dieta rica en grasa experimentaron una ganancia de peso significativamente mayor que los alimentados con pienso estándar. Sorprendentemente, la ganancia de peso observada en los ratones deficientes en *Alx3* alimentados con dieta hipercalórica fue significativamente menor que en el grupo control (Figura 18).

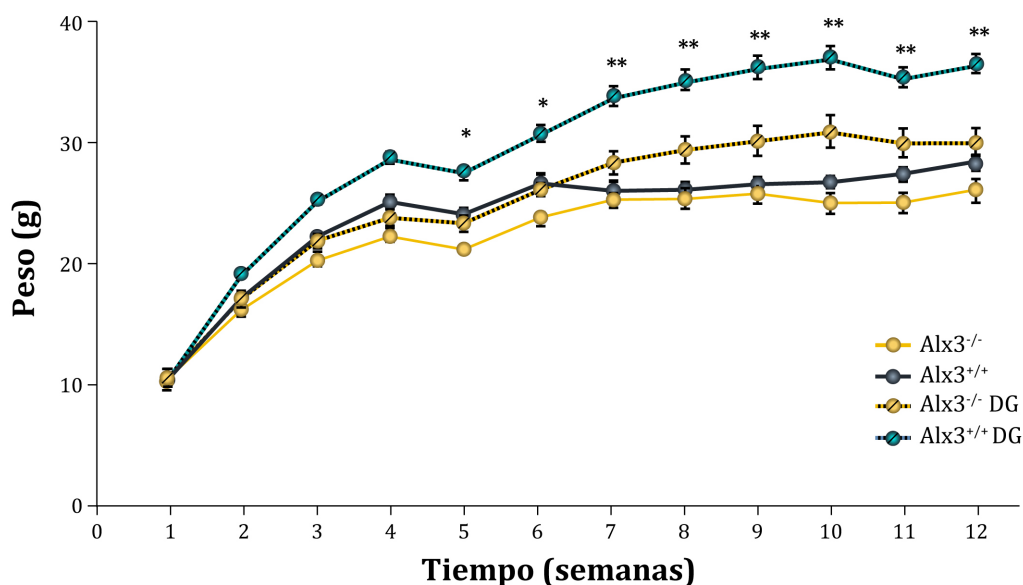


Figura 18- Ganancia de peso de animales alimentados con dieta estándar o hipercalórica. Los datos representan el valor medio \pm SEM de 10 ratones por grupo. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

La cantidad de comida ingerida por los ratones se midió durante el primer mes y al final del experimento, por lo que procedimos a determinar si existía una relación entre la ingesta y las diferentes ganancias de peso observadas.

Observamos que en el grupo de ratones alimentados con pienso estándar, los deficientes en *Alx3* comieron menos que los silvestres durante todo el experimento (Figura 19A). En el caso de los grupos alimentados con la dieta rica en grasa, la ingesta de calorías en los animales carentes de *Alx3* fue similar a la de los controles durante el primer mes. Sin embargo, tras tres meses de dieta los ratones mutantes ingerían un número significativamente menor de calorías con respecto a los controles (Figura 19B).

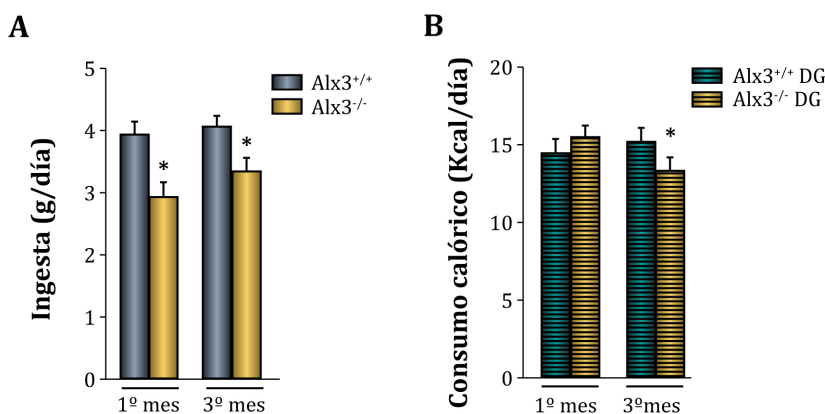


Figura 19- La deficiencia de *Alx3* reduce la ingesta. Cuantificación de la ingesta diaria de ratones alimentados desde el destete con una dieta estándar (A) o con una hipercalórica (60% de contenido en grasa) (B). Los datos representan el valor medio \pm SEM de las cuantificaciones realizadas tras el primer o tercer mes desde el inicio de la dieta tras el destete * $p \leq 0.05$ (Test de la t de Student)

4.2.4.- La deficiencia de *Alx3* disminuye la resistencia a la insulina generada por la alimentación con una dieta hipercalórica

Los ratones deficientes en *Alx3* presentan una hiperglucemia moderada y disminución de la tolerancia a la glucosa, y algunos de ellos desarrollan resistencia a la insulina cuando llegan a edades maduras (Mirasierra et al., 2011). Para investigar si esta situación podría empeorarse al someter a los ratones a una dieta rica en grasa, realizamos tests de tolerancia a la glucosa y de tolerancia a la insulina al cumplirse el primer mes de dieta y al final del experimento.

Transcurridas las cuatro primeras semanas de dieta, no se encontraron diferencias en la respuesta a la sobrecarga de glucosa entre los ratones carentes de *Alx3* y los controles (Figura 20A). Los ratones de ambos genotipos alimentados con un pienso rico en grasas presentaron intolerancia a la glucosa caracterizada por la presencia de niveles de glucosa elevados con respecto a los de los animales alimentados con pienso estándar (Figura 20B y C). Sin embargo, el nivel de intolerancia fue similar en ratones deficientes en *Alx3* y en los controles (Figura 20D).

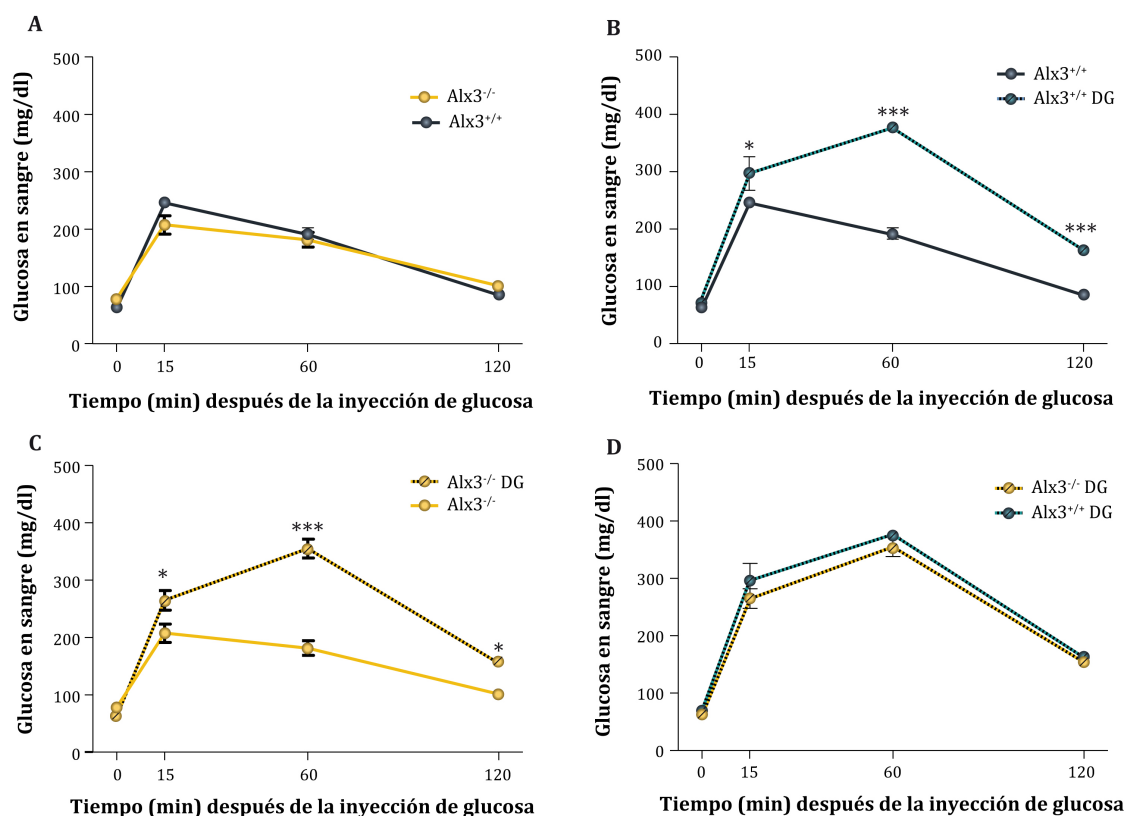


Figura 20 - Test de tolerancia a la glucosa en animales sometidos a dieta rica en grasa. Se llevaron a cabo en machos *Alx3*^{+/-} o *Alx3*^{-/-} transcurridas 4 semanas de dieta. En cada grupo se usaron 10 animales. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$ (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

La realización de un test de tolerancia a insulina en estos animales indicó que la sensibilidad a la insulina no se encontraba afectada ni en los animales silvestres ni en los animales deficientes en *Alx3* sometidos a dieta estándar o rica en grasas (Figura 21). Estos resultados sugieren que la intolerancia observada tras la sobrecarga de glucosa puede deberse a un efecto de lipotoxicidad sobre los islotes que dificulten la secreción de insulina.

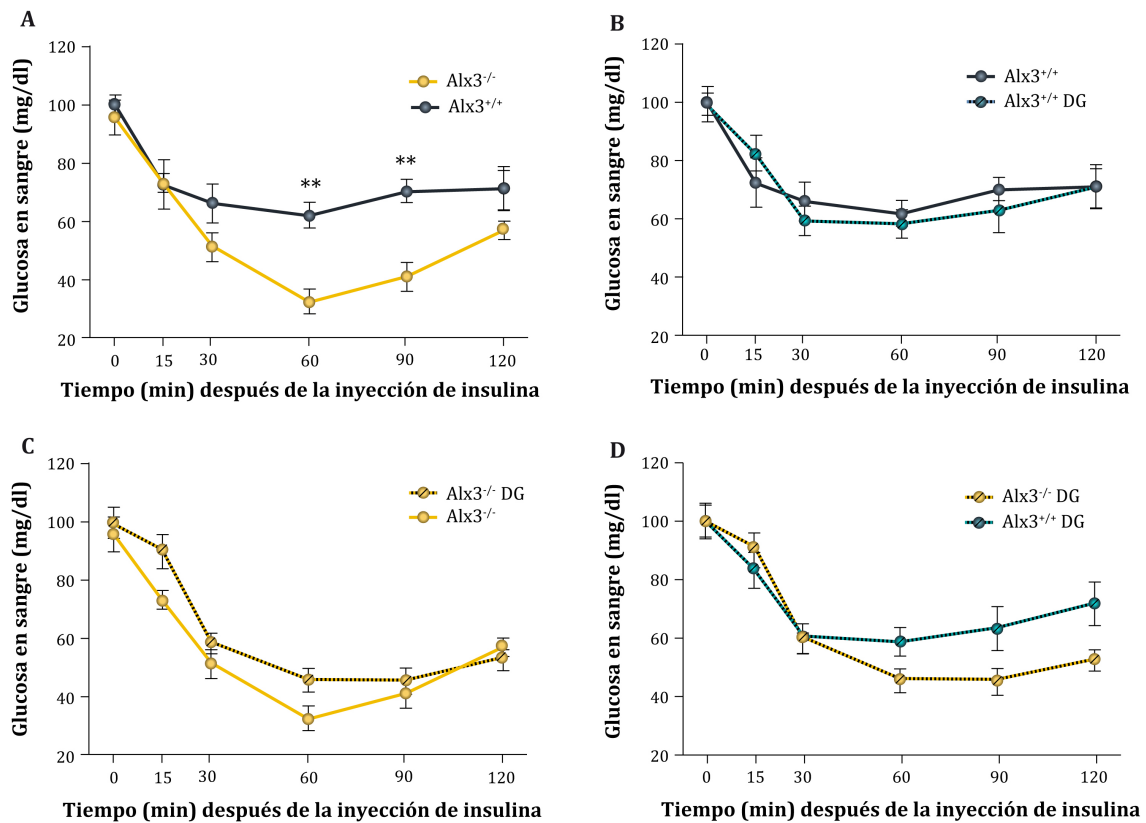


Figura 21- Test de tolerancia a la insulina en animales sometidos a dieta rica en grasa. Se llevaron a cabo en machos $Alx3^{+/+}$ o $Alx3^{-/-}$ transcurridas 4 semanas de dieta. En cada grupo se usaron 10 animales. ** $p \leq 0.01$ (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

Al finalizar el experimento tres meses tras el destete, los ratones carentes de $Alx3$ alimentados con dieta estándar mostraron una disminución de la tolerancia a una sobrecarga de glucosa con respecto a los animales control (Figura 22A), confirmando nuestros resultados anteriores (Mirasierra et al., 2011). Como era de esperar, la alimentación con la dieta hipercalórica produjo intolerancia a la glucosa en los ratones silvestres (Figura 22B).

Sorprendentemente, en los ratones deficientes en $Alx3$ la dieta hipercalórica mejoró la intolerancia a la glucosa observada con la dieta estándar (Figura 22C), y de hecho comprobamos que estos ratones son menos intolerantes a la glucosa que los animales control sometidos a dieta hipercalórica (Figura 22D).

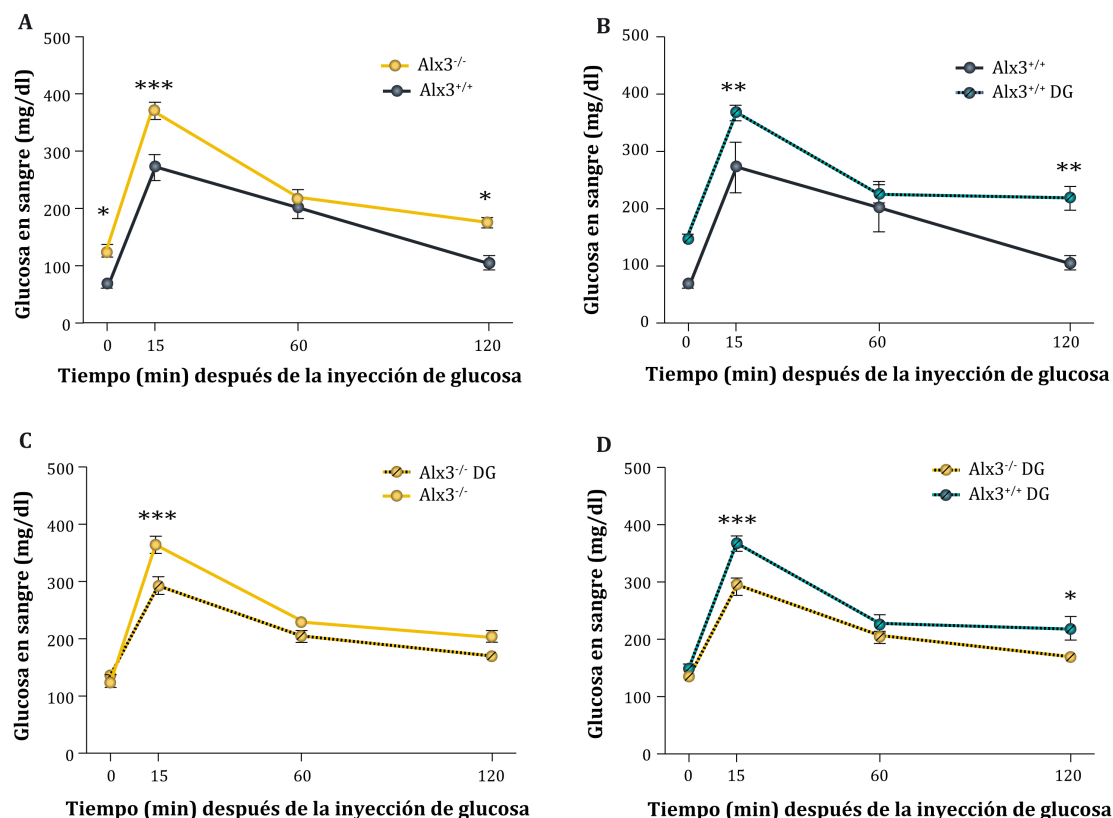


Figura 22- Test de tolerancia a la glucosa en animales sometidos a dieta rica en grasa. Se llevaron a cabo en machos Alx3^{+/+} o Alx3^{-/-} transcurridas 12 semanas de dieta. En cada grupo se usaron 10 animales. * $p \leq 0.05$ (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

La realización de tests de tolerancia a la insulina permitió confirmar que los ratones deficientes en Alx3 alimentados con una dieta estándar no muestran diferencias significativas con respecto a los controles (Figura 23A). Como era de esperar, los animales control sometidos a una dieta hipercalórica desarrollaron resistencia a la insulina (Figura 23B). Una respuesta similar, aunque algo menos acusada, se observó en los ratones deficientes en Alx3 (Figura 23C). De nuevo sorprendentemente, los ratones deficientes en Alx3 sometidos a dieta hipercalórica mostraron una mejor sensibilidad a la insulina que los controles con el mismo tipo de alimentación (Figura 23D).

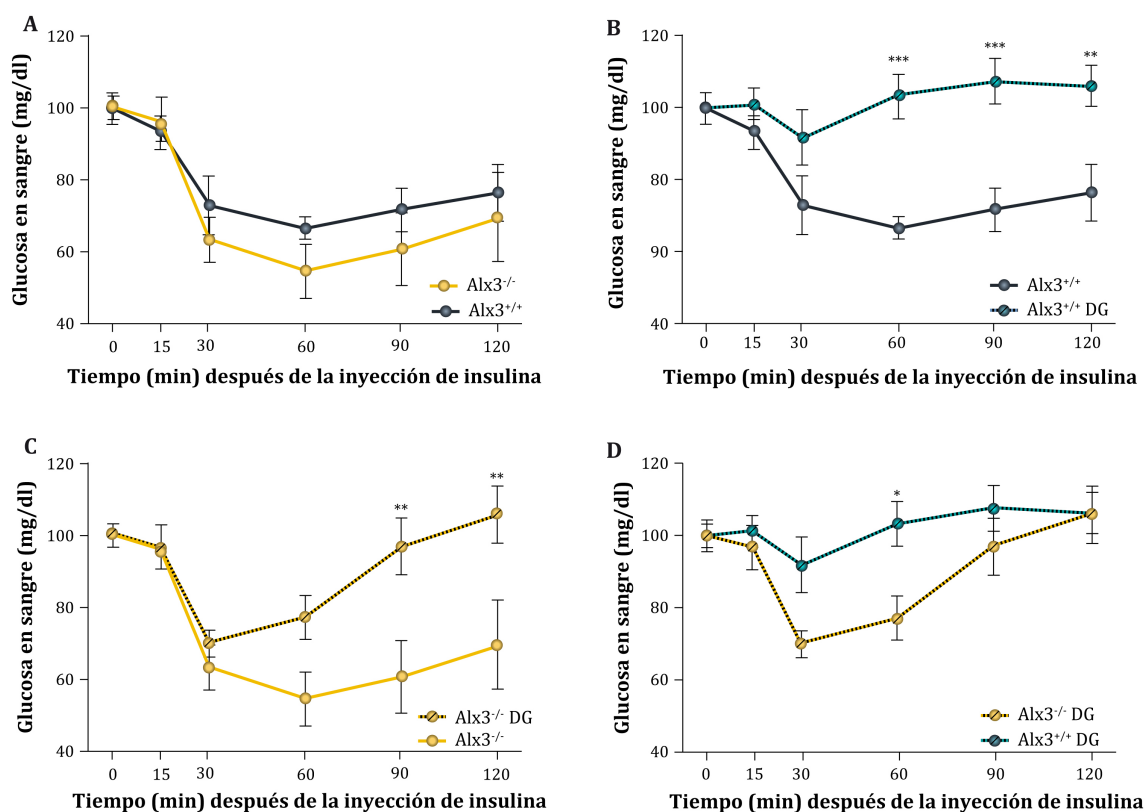


Figura 23- Test de tolerancia a la insulina en animales sometidos a dieta rica en grasa. Se llevaron a cabo en machos Alx3^{+/+} o Alx3^{-/-} transcurridas 12 semanas de dieta. En cada grupo se usaron 10 animales. *p≤0.05, **p≤0.01, ***p≤0.001 (Test de ANOVA de dos vías seguido de corrección de Bonferroni).

4.2.5.- Alx3 regula el tamaño de los adipocitos de la grasa epididimal.

La disminución en la ganancia de peso y la reducida tolerancia a la glucosa y a la insulina observadas en los experimentos anteriores nos llevaron a plantear la hipótesis según la cual la deficiencia de Alx3 puede alterar la homeostasis del metabolismo lipídico en los adipocitos. Para abordar esta hipótesis decidimos realizar, en una primera aproximación, un análisis morfométrico de los adipocitos en los depósitos de grasa epididimal.

En animales alimentados con dieta estándar determinamos que el tamaño de los adipocitos epididimales de los ratones deficientes en Alx3 es mayor que el de los controles, tal como se observa en la Figura 24. Los animales control alimentados con dieta grasa desarrollaron hiperplasia del tejido adiposo, como era de esperar tras un incremento en la ingesta de calorías que son almacenadas en forma de triglicéridos en los mismos (Figura 24B). En los ratones deficientes en Alx3 también se observó esta

hiperplasia, pero el tamaño alcanzado no superó al de los controles, sugiriendo que los adipocitos habían llegado al máximo de su capacidad de almacenamiento (Figura 24B).

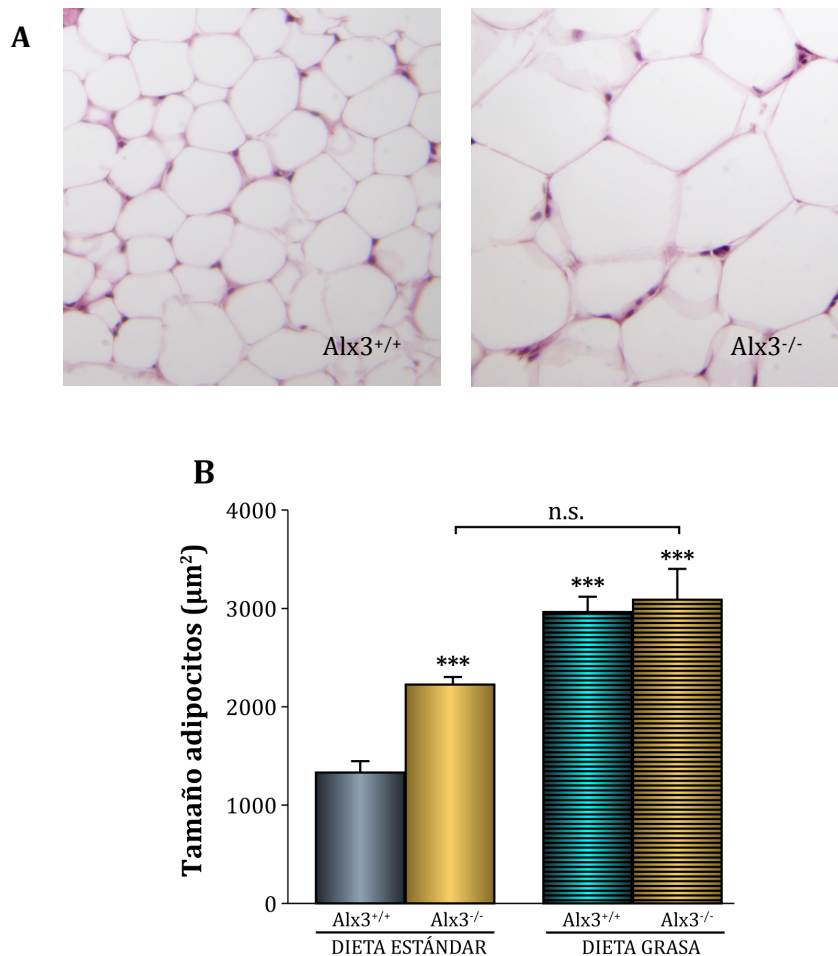


Figura 24- Mayor tamaño de los adipocitos epididimales en ratones deficientes en Alx3. A) Microfotografías representativas de los cortes histológicos de tejido adiposo epididimal de ratones control (Alx3^{+/+}) o deficientes en Alx3 (Alx3^{-/-}) alimentados con una dieta estándar. La tinción se realizó con hematoxilina. B) Cuantificación del tamaño de los adipocitos realizada a partir de preparaciones histológicas similares a las que se muestran en el panel A. ***p≤0.001 (Test *U* de Mann-Whitney) (n = 20 secciones por ratón, tres ratones por condición)

Un análisis morfométrico más detallado de la distribución de los tamaños de los adipocitos reveló que los de tamaño pequeño (> 2000 mm²) son menos abundantes en los ratones deficientes en Alx3 que en los controles, mientras que ocurre lo contrario en el caso de los adipocitos de tamaño medio-grande (> 4000 mm²) (Figura 25A). Como era de esperar, la alimentación de los animales control con una dieta hipercalórica produjo un aumento del número de adipocitos de mayor tamaño en detrimento de los de menor tamaño (Figura 25B).

En el caso de los animales deficientes en Alx3, este desplazamiento de los tamaños más pequeños a los mayores no se observó (Figura 25C). Los tamaños de los adipocitos epididimales de los ratones deficientes en Alx3 alimentados con una dieta hipercalórica y su distribución resultaron ser similares a las que se observaron en ratones control sometidos al mismo tipo de dieta (Figura 25D). Por tanto, el fenotipo del tejido graso epididimal de los ratones deficientes en Alx3, aún cuando se encuentran alimentados con una dieta estándar, corresponde al de animales silvestres alimentados con una dieta hipercalórica.

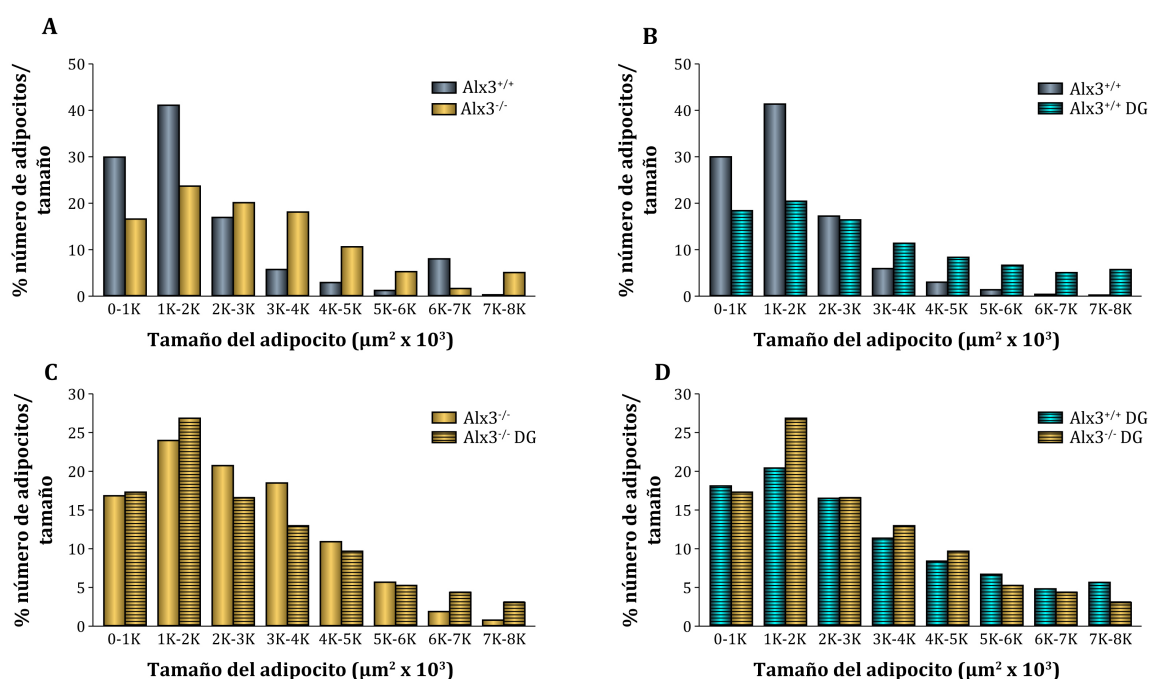


Figura 25- Análisis morfométrico de los adipocitos del tejido adiposo epididimal. A-D) Distribución de los adipocitos por tamaño. *** $p \leq 0.001$ Alx3^{+/+} vs Alx3^{-/-} (χ^2 test). *** $p \leq 0.001$ Alx3^{+/+} vs Alx3^{+/+} DG (χ^2 test).

4.2.6.- La deficiencia de Alx3 se acompaña de un incremento de la lipogénesis.

Los resultados descritos en el apartado anterior nos llevaron a plantear la posible existencia de alteraciones en el metabolismo lipídico que favorezcan su almacenamiento en el tejido adiposo. En una primera aproximación, determinamos los niveles de triglicéridos circulantes y hepáticos en ratones control o mutantes alimentados con dieta estándar o hipercalórica. Observamos que los niveles de triglicéridos plasmáticos son similares en los ratones carentes de Alx3 y en los controles (Figura 26). La administración de una dieta hipercalórica produjo un

aumento de triglicéridos circulantes, pero no se observaron diferencias significativas entre los dos genotipos de animales (Figura 26).

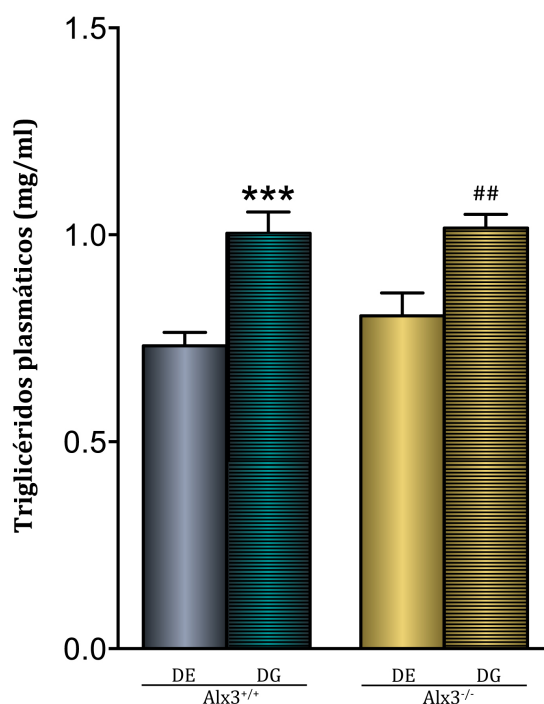


Figura 26 - La deficiencia de Alx3 no altera los triglicéridos circulantes. Niveles plasmáticos de triglicéridos en animales Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-} alimentados con dieta estándar o rica en grasa. *** $p \leq 0.001$ con respecto a la condición Alx3^{+/+} en dieta estándar. ## $p \leq 0.01$ con respecto a la condición Alx3^{-/-} en dieta estándar. (Test de la t de Student)

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en la concentración de triglicéridos hepáticos en ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 27).

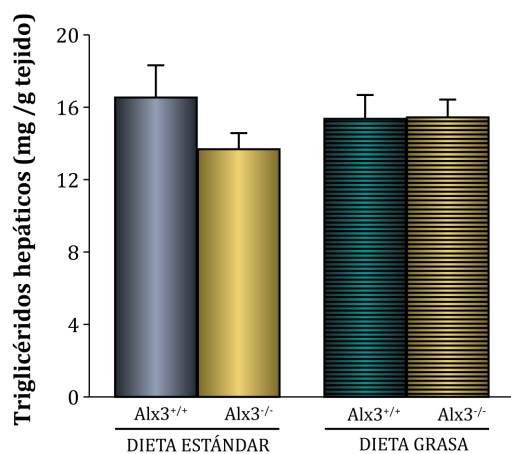


Figura 27- La deficiencia de Alx3 no altera los triglicéridos hepáticos. Niveles de triglicéridos hepáticos en animales Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-} alimentados con dieta estándar o rica en grasa.

En una segunda aproximación, investigamos si el incremento del tamaño de los adipocitos observado en los ratones deficientes en Alx3 guarda relación con un

aumento de la lipogénesis. Para ello determinamos los niveles de expresión de los genes que codifican los marcadores lipogénicos PGC-1 α , PPAR γ , DGAT1, CD36 y Cidea. PGC-1 α es un coactivador transcripcional que regula genes implicados en el metabolismo energético, con un papel determinante en la biogénesis mitocondrial (Liang and Ward, 2006). Esta proteína interacciona con el receptor nuclear PPAR- γ , implicado en la diferenciación del adipocito maduro (Ahmadian et al., 2013). Observamos que la expresión de ambos marcadores se encontraba incrementada en los adipocitos del tejido adiposo epididimal de animales Alx3^{-/-} (Figura 28). También detectamos incrementada la expresión del gen *Dgat1*, que codifica la diacilglicerol-aciltransferasa, una enzima clave en la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicerol y ácidos grasos (Figura 28). Así mismo, detectamos un incremento en la expresión del transportador de lípidos CD36 (Figura 28). Finalmente, observamos un aumento de los niveles de expresión de Cidea (Figura 28), que entre otras funciones participa en la formación de la vesícula lipídica que sirve de almacenaje en los adipocitos (Abreu-Vieira et al., 2015).

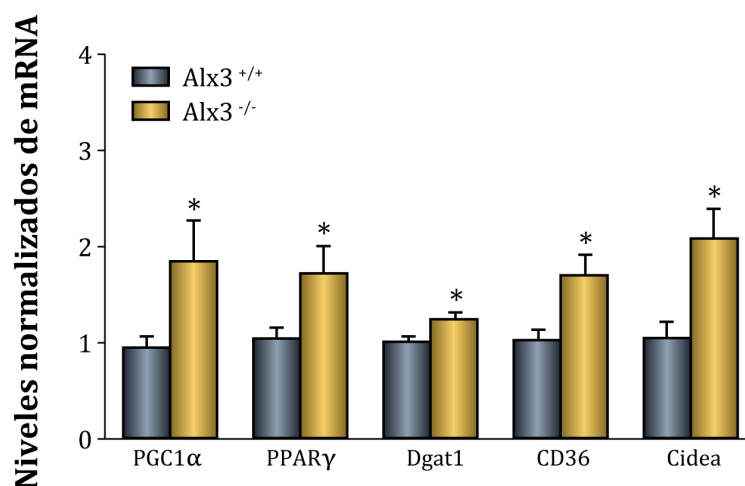


Figura 28- La deficiencia de Alx3 aumenta la expresión de marcadores lipogénicos. Niveles relativos de mRNA de PGC1- α , PPAR γ , Dgat1, CD36 y Cidea en el tejido adiposo epididimal de ratones Alx3^{+/+} y Alx3^{-/-}. *p \leq 0.05 (Test de la t de Student).

4.2.7.- Determinación de los niveles de leptina circulante.

La leptina es una hormona secretada por los adipocitos implicada en la regulación de la ingesta y del metabolismo energético. Posee un efecto anorexigénico y se secreta en respuesta a los niveles circulantes de glucosa y ácidos grasos.

Para investigar la posible existencia de una relación entre el aumento del tamaño de los adipocitos y la secreción de leptina en ratones deficientes en *Alx3*, se determinó la concentración de leptina circulante en el plasma de animales *Alx3*^{+/+} y *Alx3*^{-/-} sometidos a dieta estándar o hipercalórica. No se detectaron diferencias en los niveles de leptina en animales control o deficientes en *Alx3* alimentados con dieta estándar (Figura 29). En los animales de ambos genotipos se observó un incremento muy significativo como consecuencia de la alimentación con una dieta rica en grasa, pero no se detectaron diferencias significativas dependientes de la deficiencia de *Alx3*.

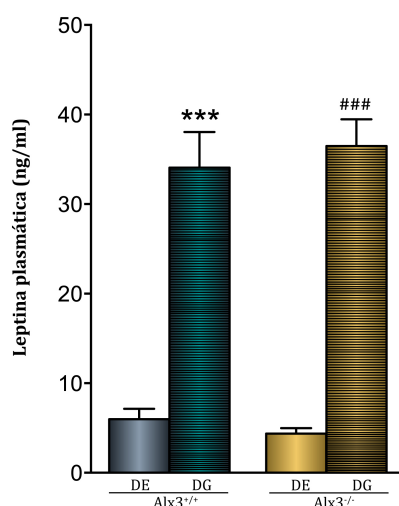


Figura 29- Concentración de leptina en plasma. Niveles plasmáticos de leptina de animales *Alx3*^{+/+} y *Alx3*^{-/-} alimentados con dieta estándar o rica en grasa *** $p \leq 0.001$ con respecto a la condición *Alx3*^{+/+} dieta estándar. ### $p \leq 0.001$ con respecto a la condición *Alx3*^{-/-} dieta estándar. (Test de la t de Student)

5.-DISCUSIÓN

5.1.-Alx3 y el estrés oxidativo

El estrés oxidativo generado por la hiperglucemia crónica se postula como uno de los principales efectores del fallo funcional de la célula β del islote pancreático, tanto en la diabetes de tipo I como en la diabetes de tipo II. Así mismo, el estrés oxidativo constituye la causa principal del desarrollo de malformaciones congénitas asociadas al desarrollo de hiperglucemia severa durante el embarazo. De forma convergente, en los diferentes tipos de diabetes, se ha determinado que los factores de transcripción son objetivos directos del estrés oxidativo, afectando a los genes diana que están bajo su regulación.

Publicaciones recientes de nuestro grupo evidencian que mutaciones en el gen que codifica el factor de transcripción Alx3 induce defectos a nivel craneofacial y de tubo neural durante la embriogénesis. Dichas malformaciones congénitas asociadas a la deficiencia de Alx3 se ven incrementadas en el contexto de la diabetes gestacional. El mecanismo protector de Alx3 se basa en su expresión proporcional a los niveles de glucosa que induce a su vez la transcripción de Foxo1, regulador principal de la expresión de enzimas antioxidantes (Garcia-Sanz et al., 2017). Estos mecanismos moleculares parecen indicar que Alx3 podría estar implicado también en la defensa oxidativa de los islotes pancreáticos en un contexto de glucotoxicidad.

La visualización de especies reactivas de oxígeno mediante sondas fluorescentes ha sido ampliamente usado en investigación (Bindokas et al., 2003, Pi et al., 2007). El compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluorescein (DCF) resultado de la oxidación del compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCF), fue de los primeros indicadores usados en estrés oxidativo. Este compuesto se añade generalmente en forma de ester diacetato (DA), lo que le permite su permeabilidad a través de la membrana. Esta difusión provoca que el tiempo de observación de la fluorescencia en la célula esté limitada por el tiempo. La adición de grupos clorometil (CM) en la variante CM-H₂DCFDA reducen la fuga pasiva a través de la membrana plasmática. Además, la modificación de los grupos diacetato por parte de esterasas intracelulares aumenta su grado de retención. Uno de los principales problemas a la hora de abordar el estudio del estado oxidativo celular es la detección de las propias especies reactivas donde la especificidad y sensibilidad son los

principales objetivos. En este estudio se ha usado una sonda fluorescente CM-H₂DCFDA que posee una mayor afinidad por H₂O₂ en este sistema (Pi et al., 2007). A pesar de que el islote es una agregación celular bastante compacta, en las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal podemos observar fluorescencia en los planos correspondientes al interior del islote. Además, la proporción de células beta respecto al resto de tipos celulares es muy superior, pudiendo argumentar que las especies reactivas se producen mayoritariamente en las células beta.

Los ensayos *in vitro* realizados con islotes provenían tanto de animales salvajes como deficientes en Alx3 de edad joven y normoglucémicos, ya que las alteraciones mas notables en los niveles de glucosa en sangre se producen en edad adulta. Es decir, los islotes extraídos presentaban una viabilidad comparable a la de los silvestres. La exposición de estos islotes a concentraciones suprafisiológicas de glucosa solo produce la detección de especies reactivas en aquellos aislados de ratones deficientes en Alx3, tanto con un estímulo corto como a tiempos largos. La ausencia de señal fluorescente en los islotes de los animales salvajes es un evento esperable ya que los islotes están sometidos a diario a variaciones en la concentración de glucosa debido a la ingesta y la generación de especies reactivas sirve de señal para la secreción de insulina (Bindokas et al., 2003, Pi et al., 2007). En este contexto, la producción controlada de especies reactivas está implicada en la secreción de insulina inducida por glucosa (GSIS) y la acumulación crónica de especies reactivas produce estrés oxidativo que altera la secreción de insulina e induce la disfunción en la célula β . Sabemos que, aunque poseen una menor concentración de insulina por islote, los islotes Alx3^{-/-} poseen una adecuada secreción de insulina en respuesta a glucosa (Mirasierra et al., 2011) por lo que el efecto deletéreo de la acumulación de especies reactivas no afecte a la secreción de insulina. Además, uno de los efectos mejor estudiados de el estrés oxidativo en la célula β es la inactivación del factor de transcripción Pdx1 (Robertson, 2004), directamente implicado en la síntesis de insulina y que en nuestro sistema no vemos alteración ni en su síntesis ni en su unión al promotor de insulina (Mirasierra et al., 2011). La exposición de los islotes a concentraciones elevadas de palmitato no produce un aumento en la producción de especies reactivas si no existe al tiempo una concentración elevada de glucosa. Este fenómeno, denominado glucolipotoxicidad (Prentki et al., 2002), pone de manifiesto como, a concentraciones fisiológicas de glucosa, el exceso de ácidos grasos se oxida en

la mitocondria pero cuando los niveles de glucosa y ácidos grasos están elevados, se produce acumulación de citrato en el citosol, inhibiendo a la enzima responsable del transporte de los ácidos grasos a la mitocondria. Este fenómeno se ha observado en líneas celulares secretoras de insulina e islotes aislados donde la incubación prolongada con niveles altos de ácidos grasos está asociado con la inhibición de la secreción de insulina por glucosa (Barlow et al., 2016), defectos en la expresión del gen de insulina (Hagman et al., 2005) y apoptosis (Piro et al., 2002). Estos hechos ponen de manifiesto que los efectos deletéreos del exceso de lípidos requieren de un contexto de hiperglucemia previa pero que la toxicidad mediada por glucosa es independiente de la presencia de niveles elevados de lípidos.

La mitocondria es la responsable de la producción de ATP en la célula siendo este un evento fundamental en el metabolismo energético. Los defectos en la función respiratoria son los causantes directos de numerosas patologías como la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Parkinson, la fisopatología del envejecimiento y la diabetes y sus complicaciones. Diversas mutaciones en el DNA mitocondrial son responsables de algunos tipos de diabetes gestacional y alteraciones en la ruta oxidativa provoca resistencia a la insulina en tejidos periféricos como el hígado y el músculo en pacientes diabéticos tipo II. Experimentos realizados en ratones demuestran que la administración de estreptozotocina altera la capacidad respiratoria mitocondrial en el hígado, músculo y corazón. En la célula β pancreática se observa como el fallo mitocondrial se transforma en una menor respuesta en la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. Para comprobar si los islotes de animales deficientes en $Alx3^{-/-}$ eran mas susceptibles a alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial usamos antimicina. La antimicina A se une al sitio Q de la citocromo C reductasa, inhibiendo por tanto la oxidación del ubiquinol en la cadena de transporte de electrones de la respiración aerobia de las células. La inhibición de esta reacción interrumpe la formación del gradiente de protones de la membrana interna de la mitocondria. De esta forma, los protones no son capaces de pasar a través del complejo ATPasa por lo que se bloquea la producción de ATP. Esta inhibición provoca además un incremento en la formación de radical tóxico superóxido (Henquin, 2000). Este inhibidor se ha usado en experimentos con la línea celular INS-1 donde una concentración de 2 μ M afecta a la secreción de insulina en presencia de 20 mM de glucosa (Pi et al., 2010). Los islotes de animales $Alx3^{-/-}$ producen una aumento

significativo en la producción de especies reactivas de oxígeno de forma dependiente al aumento de concentración de antimicina que es superior al observado en los animales salvajes por lo que sabemos que Alx3 está implicado en los fenómenos de estrés oxidativo.

Como ya hemos mencionado en la introducción, el estrés oxidativo y las especies reactivas de oxígeno podrían estar directamente relacionados con los defectos observados en los islotes deficientes de Alx3. En nuestro estudio, la carencia de Alx3 previene la inducción de la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes que constituyen la primera barrera de defensa ya que interaccionan directamente con las especies reactivas. Los islotes Alx3^{-/-} no presentan expresión de catalasa en respuesta a glucosa a tiempos cortos y de manganeso superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa a 48 horas. Este mismo resultado se observa en embriones Alx3^{-/-} de ratonas hiperglucémicas (Garcia-Sanz et al., 2017). La inducción de estas enzimas en respuesta a la presencia de estrés mediado por especies reactivas de oxígeno está regulada mayoritariamente a nivel transcripcional. Dos de los factores mejor caracterizados implicados en esta regulación son Nrf2 y FoxO1. Nrf2 impide la acumulación de especies reactivas en islotes aislados y líneas celulares de célula β mediante la inducción de la enzima glutatión peroxidasa, reduciendo los niveles de nitrotirosina y apoptosis (Yagishita et al., 2014). FoxO1 en la célula β forma un complejo proteico con la proteína promielocítica Pml y la enzima deacetilasa Sirt1 induciendo la expresión de NeuroD y MafA, factores de transcripción determinantes en la expresión del gen de insulina (Ins2) (Kitamura et al., 2005). En nuestro sistema no encontramos diferencias significativas en la expresión de estos factores aunque sabemos que FoxO1 interacciona con Alx3 en el contexto embrionario, siendo clave en la protección frente al daño por hiperglucemia (Garcia-Sanz et al., 2017).

5.2.- Alx3 y la homeostasis corporal

La ausencia de Alx3 altera la funcionalidad y viabilidad del islote pancreático comprometiendo la homeostasis glucémica en el ratón adulto. Este fenotipo no se puede incluir dentro de la clasificación actual de diabetes pero se conoce que ciertas mutaciones, o incluso variantes comunes, de algunos de los genes que codifican

factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de la función celular aumentando el riesgo de desarrollar diabetes.

La deficiencia de Alx3 en el modelo murino presenta un fenotipo dependiente de la edad. En ratones jóvenes (12-16 semanas de vida) se observa que existe un fallo funcional en el islote, presentando un tamaño menor e incremento de la apoptosis. Este defecto produce alteraciones de la glucemia aunque no se observa incidencia en la tolerancia a la insulina. Por el contrario, los animales adultos (36-40 semanas de vida) son hiperglucémicos, con niveles elevados de insulina en sangre y grados variables de resistencia a la insulina, evidenciando la relación de la ausencia de Alx3 y la predisposición al desarrollo de diabetes (Mirasierra et al., 2011). Esta susceptibilidad no se observa en todos los animales estudiados, siendo un porcentaje ligeramente reducido de ratones los que presentan dicho fenotipo. Sabida la fuerte relación entre los factores ambientales y el desarrollo de diabetes tipo II, el estudio de animales carentes de Alx3 alimentados con una dieta rica en grasa se propuso como línea experimental.

El modelo de obesidad inducida por dieta reproduce el incremento del consumo de comidas con un alto contenido calórico en la sociedad, principal responsable de la obesidad. En nuestro estudio proporciona un entorno propicio para el estudio de alteraciones funcionales del islote pancreático (Golson et al., 2010, Dreja et al., 2010), del proceso de desarrollo de resistencia a la insulina (Wang and Liao, 2012) y de los efectos deletéreos del estrés oxidativo (Furukawa et al., 2004).

Los ratones deficientes de Alx3 presentan un peso similar a los ratones salvajes cuando se les alimenta *ad libitum* con pienso estándar. Esta situación sorprende si atendemos al hecho de que su ingesta es significativamente menor. Estas diferencias se mantienen en aquellos ratones que se sustentan con pienso rico en grasa. El estudio de la distribución de grasa corporal mediante resonancia magnética corporal (RMN) (datos no publicados) reveló que los ratones deficientes en Alx3 poseen una mayor proporción de tejido adiposo, sobre todo, en los depósitos viscerales. El contenido graso corporal explica porque, aún comiendo menos, tienen un peso parecido.

Los adipocitos son las principales células que componen el tejido adiposo, con una importancia crucial en la homeostasis corporal. Su función principal es el almacenaje de triglicéridos y su movilización en situaciones de privación energética. Además, constituye un verdadero órgano endocrino debido a la gran cantidad de

hormonas y otros factores secretados que tienen un profundo impacto en otros tejidos, en la regulación del apetito, la sensibilidad a la insulina, la respuesta inmunológica y las enfermedades vasculares.

En el análisis pormenorizado del tejido adiposo en nuestro estudio encontramos que los animales salvajes poseen una distribución de adipocitos por tamaño donde son mas frecuentes las medidas pequeñas. Cuando estos animales son alimentados con una dieta rica en grasa, se desplaza la distribución hacia tamaños mas grandes, indicando que los adipocitos están aumentando su volumen al almacenar grasa fenómenos denominado hipertofia del adipocito. En los animales deficientes en *Alx3* no existe ningún cambio en la frecuencia de adipocitos por tamaño; el ratón en dieta estándar tiene un tamaño medio superior al del ratón salvaje que no se ve modificado con el cambio a una dieta rica en grasa. Podemos inferir que los adipocitos de los animales deficientes en *Alx3* parten de una situación hipertrófica ya que poseen el mismo tamaño y la misma distribución que los animales salvajes en dieta grasa.

Sabemos que *Alx3* no se expresa en la célula adiposa madura pero si en las células progenitoras (datos no publicados). Además hemos comprobado que la ausencia de *Alx3* supone un aumento de expresión de genes como *Pgc1 α* . En el músculo se ha visto que un aumento en la expresión de *Pgc1 α* está asociado con una disminución en la captación de glucosa en respuesta a insulina debido a un incremento en la exportación de ácidos grasos/re-esterificación de triglicéridos debido a un aumento en la expresión de *CD36* y *Dgat1*. Esta situación provoca que se exceda la capacidad mitocondrial de oxidación de ácidos grasos y resulte en una acumulación de lípidos en la célula (Ali et al., 2013). Además, los estudios de calorimetría indirecta realizados en este experimento indican que el coeficiente respiratorio (RER) de estos animales es mas bajo que el de animales salvajes aunque no lo suficiente como para justificar que sea un metabolismo cuyo único sustrato sea la grasa. Estos datos en conjunto parecen indicar que existe una tasa mayor de recambio lipídico. Estos hechos, determinados recientemente, abre una línea muy interesante sobre el papel de *Alx3* en el desarrollo del adipocito desde las células inmaduras a la célula adulta diferenciada.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente tesis doctoral son las siguientes:

1. La carencia de Alx3 provoca estrés oxidativo en los islotes pancreáticos.
2. La expresión de Alx3 es necesaria para la expresión de genes que codifican las enzimas antioxidantes catalasa, Gpx1 y MnSOD.
3. La carencia de Alx3 altera los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo producido por niveles altos de glucosa.
4. La deficiencia de Alx3 aumenta la vulnerabilidad de los islotes pancreáticos a generar estrés oxidativo en ratones alimentados con una dieta hipercalórica.
5. La deficiencia de Alx3 previene la hiperplasia de los islotes pancreáticos en respuesta a una dieta hipercalórica.
6. La deficiencia de Alx3 disminuye la ingesta, que se traduce en una menor ganancia de peso en animales sometidos a alimentación con una dieta hipercalórica.
7. Alx3 es importante para la regulación de la homeostasis glucémica en animales alimentados con dieta estándar.
8. En animales alimentados con dieta hipercalórica, la deficiencia de Alx3 previene la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina.
9. Alx3 regula el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo epididimal.
10. Alx3 limita la lipogénesis en el tejido adiposo epididimal.

BIBLIOGRAFÍA

- ABREU-VIEIRA, G., FISCHER, A. W., MATTSSON, C., DE JONG, J. M., SHABALINA, I. G., RYDEN, M., LAURENCIKIENE, J., ARNER, P., CANNON, B., NEDERGAARD, J. & PETROVIC, N. 2015. Cidea improves the metabolic profile through expansion of adipose tissue. *Nature communications*, 6, 7433.
- ACHARYA, J. D. & GHASKADBI, S. S. 2010. Islets and their antioxidant defense. *Islets*, 2, 225-35.
- AHMADIAN, M., SUH, J. M., HAH, N., LIDDLE, C., ATKINS, A. R., DOWNES, M. & EVANS, R. M. 2013. PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19, 557-66.
- ALI, A. T., HOCHFELD, W. E., MYBURGH, R. & PEPPER, M. S. 2013. Adipocyte and adipogenesis. *European journal of cell biology*, 92, 229-36.
- ALLEN, D. A., YAQOOB, M. M. & HARWOOD, S. M. 2005. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16, 705-13.
- ASGHAR, A. & SHEIKH, N. 2017. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cellular immunology*.
- BARLOW, J., JENSEN, V. H., JASTROCH, M. & AFFOURTIT, C. 2016. Palmitate-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion precedes mitochondrial dysfunction in mouse pancreatic islets. *The Biochemical journal*, 473, 487-96.
- BINDOKAS, V. P., KUZNETSOV, A., SREENAN, S., POLONSKY, K. S., ROE, M. W. & PHILIPSON, L. H. 2003. Visualizing superoxide production in normal and diabetic rat islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*, 278, 9796-801.
- BISHAY, R. H. & GREENFIELD, J. R. 2016. A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY. *The Medical journal of Australia*, 205, 480-485.
- BLOM, H. J., SHAW, G. M., DEN HEIJER, M. & FINNELL, R. H. 2006. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nature reviews. Neuroscience*, 7, 724-31.
- BLUESTONE, J. A., HEROLD, K. & EISENBARTH, G. 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464, 1293-300.

- BONNEFOND, A., PHILIPPE, J., DURAND, E., DECHAUME, A., HUYVAERT, M., MONTAGNE, L., MARRE, M., BALKAU, B., FAJARDY, I., VAMBERGUE, A., VATIN, V., DELPLANQUE, J., LE GUILCHER, D., DE GRAEVE, F., LECOEUR, C., SAND, O., VAXILLAIRE, M. & FROGUEL, P. 2012. Whole-exome sequencing and high throughput genotyping identified KCNJ11 as the thirteenth MODY gene. *PloS one*, 7, e37423.
- BROWNLEE, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54, 1615-25.
- COLOMBO, C., PORZIO, O., LIU, M., MASSA, O., VASTA, M., SALARDI, S., BECCARIA, L., MONCIOTTI, C., TONI, S., PEDERSEN, O., HANSEN, T., FEDERICI, L., PESAVENTO, R., CADARIO, F., FEDERICI, G., GHIRRI, P., ARVAN, P., IAFUSCO, D. & BARBETTI, F. 2008. Seven mutations in the human insulin gene linked to permanent neonatal/infancy-onset diabetes mellitus. *The Journal of clinical investigation*, 118, 2148-56.
- DREJA, T., JOVANOVIĆ, Z., RASCHE, A., KLUGE, R., HERWIG, R., TUNG, Y. C., JOOST, H. G., YEO, G. S. & AL-HASANI, H. 2010. Diet-induced gene expression of isolated pancreatic islets from a polygenic mouse model of the metabolic syndrome. *Diabetologia*, 53, 309-20.
- EBIHARA, K., OGAWA, Y., MASUZAKI, H., SHINTANI, M., MIYANAGA, F., AIZAWA-ABE, M., HAYASHI, T., HOSODA, K., INOUE, G., YOSHIMASA, Y., GAVRILOVA, O., REITMAN, M. L. & NAKAO, K. 2001. Transgenic overexpression of leptin rescues insulin resistance and diabetes in a mouse model of lipotrophic diabetes. *Diabetes*, 50, 1440-8.
- FERNANDEZ-PEREZ, A. & VALLEJO, M. 2014. Pdx1 and USF transcription factors coordinately regulate Alx3 gene expression in pancreatic beta-cells. *The Biochemical journal*, 463, 287-96.
- FINKEL, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194, 7-15.
- FOLCH, J., LEES, M. & SLOANE STANLEY, G. H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226, 497-509.
- FRAYLING, T. M., EVANS, J. C., BULMAN, M. P., PEARSON, E., ALLEN, L., OWEN, K., BINGHAM, C., HANNEMANN, M., SHEPHERD, M., ELLARD, S. & HATTERSLEY, A.

- T. 2001. beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes*, 50 Suppl 1, S94-100.
- FURUKAWA, S., FUJITA, T., SHIMABUKURO, M., IWAKI, M., YAMADA, Y., NAKAJIMA, Y., NAKAYAMA, O., MAKISHIMA, M., MATSUDA, M. & SHIMOMURA, I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 114, 1752-61.
- GALARRAGA, M., CAMPION, J., MUNOZ-BARRUTIA, A., BOQUE, N., MORENO, H., MARTINEZ, J. A., MILAGRO, F. & ORTIZ-DE-SOLORZANO, C. 2012. Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *Journal of lipid research*, 53, 2791-6.
- GARCIA-SANZ, P., MIRASIERRA, M., MORATALLA, R. & VALLEJO, M. 2017. Embryonic defence mechanisms against glucose-dependent oxidative stress require enhanced expression of Alx3 to prevent malformations during diabetic pregnancy. *Scientific reports*, 7, 389.
- GARIN, I., EDGHILL, E. L., AKERMAN, I., RUBIO-CABEZAS, O., RICA, I., LOCKE, J. M., MAESTRO, M. A., ALSHAIKH, A., BUNDACK, R., DEL CASTILLO, G., DEEB, A., DEISS, D., FERNANDEZ, J. M., GODBOLE, K., HUSSAIN, K., O'CONNELL, M., KLUPA, T., KOLOUSKOVA, S., MOHSIN, F., PERLMAN, K., SUMNIK, Z., RIAL, J. M., UGARTE, E., VASANTHI, T., JOHNSTONE, K., FLANAGAN, S. E., MARTINEZ, R., CASTANO, C., PATCH, A. M., FERNANDEZ-REBOLLO, E., RAILE, K., MORGAN, N., HARRIES, L. W., CASTANO, L., ELLARD, S., FERRER, J., PEREZ DE NANCLARES, G. & HATTERSLEY, A. T. 2010. Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3105-10.
- GEHRING, W. J., QIAN, Y. Q., BILLETER, M., FURUKUBO-TOKUNAGA, K., SCHIER, A. F., RESENDEZ-PEREZ, D., AFFOLTER, M., OTTING, G. & WUTHRICH, K. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*, 78, 211-23.
- GIACCO, F. & BROWNLEE, M. 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107, 1058-70.
- GIORGIO, M., MIGLIACCIO, E., ORSINI, F., PAOLUCCI, D., MORONI, M., CONTURSI, C., PELLICCIA, G., LUZI, L., MINUCCI, S., MARCACCIO, M., PINTON, P., RIZZUTO, R., BERNARDI, P., PAOLUCCI, F. & PELICCI, P. G. 2005. Electron transfer between

- cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell*, 122, 221-33.
- GOLSON, M. L., MISFELDT, A. A., KOPSOMBUT, U. G., PETERSEN, C. P. & GANNON, M. 2010. High Fat Diet Regulation of beta-Cell Proliferation and beta-Cell Mass. *The open endocrinology journal*, 4.
- GOSMAIN, Y., AVRIL, I., MAMIN, A. & PHILIPPE, J. 2007. Pax-6 and c-Maf functionally interact with the alpha-cell-specific DNA element G1 in vivo to promote glucagon gene expression. *The Journal of biological chemistry*, 282, 35024-34.
- GUO, S., DAI, C., GUO, M., TAYLOR, B., HARMON, J. S., SANDER, M., ROBERTSON, R. P., POWERS, A. C. & STEIN, R. 2013. Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 123, 3305-16.
- HAGMAN, D. K., HAYS, L. B., PARAZZOLI, S. D. & POITOUT, V. 2005. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *The Journal of biological chemistry*, 280, 32413-8.
- HATTERSLEY, A. T. & PATEL, K. A. 2017. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia*.
- HENQUIN, J. C. 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes*, 49, 1751-60.
- HOLZ, G. G. & HABENER, J. F. 1992. Signal transduction crosstalk in the endocrine system: pancreatic beta-cells and the glucose competence concept. *Trends in biochemical sciences*, 17, 388-93.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-7.
- ILES, K. E. & FORMAN, H. J. 2002. Macrophage signaling and respiratory burst. *Immunologic research*, 26, 95-105.
- JUGESSUR, A., SHI, M., GJESSING, H. K., LIE, R. T., WILCOX, A. J., WEINBERG, C. R., CHRISTENSEN, K., BOYLES, A. L., DAACK-HIRSCH, S., TRUNG, T. N., BILLE, C., LIDRAL, A. C. & MURRAY, J. C. 2009. Genetic determinants of facial clefting: analysis of 357 candidate genes using two national cleft studies from Scandinavia. *PloS one*, 4, e5385.
- KANDA, H., TATEYA, S., TAMORI, Y., KOTANI, K., HIASA, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MIYACHI, H., MAEDA, S., EGASHIRA, K. & KASUGA, M. 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance,

- and hepatic steatosis in obesity. *The Journal of clinical investigation*, 116, 1494-505.
- KANETO, H., KATAKAMI, N., MATSUHISA, M. & MATSUOKA, T. A. 2010. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2010, 453892.
- KATSAROU, A., GUDBJORNSDOTTIR, S., RAWSHANI, A., DABELEA, D., BONIFACIO, E., ANDERSON, B. J., JACOBSEN, L. M., SCHATZ, D. A. & LERNMARK, A. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17016.
- KITAMURA, Y. I., KITAMURA, T., KRUSE, J. P., RAUM, J. C., STEIN, R., GU, W. & ACCILI, D. 2005. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell metabolism*, 2, 153-63.
- KUBOTA, N., TERAUCHI, Y., YAMAUCHI, T., KUBOTA, T., MOROI, M., MATSUI, J., ETO, K., YAMASHITA, T., KAMON, J., SATOH, H., YANO, W., FROGUEL, P., NAGAI, R., KIMURA, S., KADOWAKI, T. & NODA, T. 2002. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *The Journal of biological chemistry*, 277, 25863-6.
- LAKHWANI, S., GARCIA-SANZ, P. & VALLEJO, M. 2010. Alx3-deficient mice exhibit folic acid-resistant craniofacial midline and neural tube closure defects. *Developmental biology*, 344, 869-80.
- LAYBUTT, R., HASENKAMP, W., GROFF, A., GREY, S., JONAS, J. C., KANETO, H., SHARMA, A., BONNER-WEIR, S. & WEIR, G. 2001. beta-cell adaptation to hyperglycemia. *Diabetes*, 50 Suppl 1, S180-1.
- LELOUP, C., TOURREL-CUZIN, C., MAGNAN, C., KARACA, M., CASTEL, J., CARNEIRO, L., COLOMBANI, A. L., KTORZA, A., CASTEILLA, L. & PENICAUD, L. 2009. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes*, 58, 673-81.
- LIANG, H. & WARD, W. F. 2006. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education*, 30, 145-51.
- LOH, K., DENG, H., FUKUSHIMA, A., CAI, X., BOIVIN, B., GALIC, S., BRUCE, C., SHIELDS, B. J., SKIBA, B., OOMS, L. M., STEPTO, N., WU, B., MITCHELL, C. A., TONKS, N. K., WATT, M. J., FEBBRAIO, M. A., CRACK, P. J., ANDRIKOPOULOS, S. & TIGANIS, T. 2009. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell metabolism*, 10, 260-72.

- LUMENG, C. N. & SALTIEL, A. R. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, 121, 2111-7.
- MENG, T. C., BUCKLEY, D. A., GALIC, S., TIGANIS, T. & TONKS, N. K. 2004. Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *The Journal of biological chemistry*, 279, 37716-25.
- MIRASIERRA, M., FERNANDEZ-PEREZ, A., DIAZ-PRIETO, N. & VALLEJO, M. 2011. Alx3-deficient mice exhibit decreased insulin in beta cells, altered glucose homeostasis and increased apoptosis in pancreatic islets. *Diabetologia*, 54, 403-14.
- MIRASIERRA, M. & VALLEJO, M. 2006. The homeoprotein Alx3 expressed in pancreatic beta-cells regulates insulin gene transcription by interacting with the basic helix-loop-helix protein E47. *Molecular endocrinology*, 20, 2876-89.
- MIRASIERRA, M. & VALLEJO, M. 2016. Glucose-dependent downregulation of glucagon gene expression mediated by selective interactions between ALX3 and PAX6 in mouse alpha cells. *Diabetologia*, 59, 766-75.
- OSBORN, O. & OLEFSKY, J. M. 2012. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine*, 18, 363-74.
- PEARSON, E. R., FLECHTNER, I., NJOLSTAD, P. R., MALECKI, M. T., FLANAGAN, S. E., LARKIN, B., ASHCROFT, F. M., KLIMES, I., CODNER, E., IOTOVA, V., SLINGERLAND, A. S., SHIELD, J., ROBERT, J. J., HOLST, J. J., CLARK, P. M., ELLARD, S., SOVIK, O., POLAK, M. & HATTERSLEY, A. T. 2006. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *The New England journal of medicine*, 355, 467-77.
- PEREZ-VILLAMIL, B., MIRASIERRA, M. & VALLEJO, M. 2004. The homeoprotein Alx3 contains discrete functional domains and exhibits cell-specific and selective monomeric binding and transactivation. *The Journal of biological chemistry*, 279, 38062-71.
- PI, J., BAI, Y., DANIEL, K. W., LIU, D., LYGHTE, O., EDELSTEIN, D., BROWNLIE, M., CORKEY, B. E. & COLLINS, S. 2009. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology*, 150, 3040-8.

- PI, J., BAI, Y., ZHANG, Q., WONG, V., FLOERING, L. M., DANIEL, K., REECE, J. M., DEENEY, J. T., ANDERSEN, M. E., CORKEY, B. E. & COLLINS, S. 2007. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*, 56, 1783-91.
- PI, J., ZHANG, Q., FU, J., WOODS, C. G., HOU, Y., CORKEY, B. E., COLLINS, S. & ANDERSEN, M. E. 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and applied pharmacology*, 244, 77-83.
- PIRO, S., ANELLO, M., DI PIETRO, C., LIZZIO, M. N., PATANE, G., RABUAZZO, A. M., VIGNERI, R., PURRELLO, M. & PURRELLO, F. 2002. Chronic exposure to free fatty acids or high glucose induces apoptosis in rat pancreatic islets: possible role of oxidative stress. *Metabolism: clinical and experimental*, 51, 1340-7.
- PRENTKI, M., JOLY, E., EL-ASSAAD, W. & RODUIT, R. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S405-13.
- PRENTKI, M. & NOLAN, C. J. 2006. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*, 116, 1802-12.
- QU, S., TUCKER, S. C., EHRLICH, J. S., LEVORSE, J. M., FLAHERTY, L. A., WISDOM, R. & VOGT, T. F. 1998. Mutations in mouse *Aristaless-like4* cause Strong's luxoid polydactyly. *Development*, 125, 2711-21.
- ROBERTSON, R. P. 2004. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *The Journal of biological chemistry*, 279, 42351-4.
- ROBERTSON, R. P., HARMON, J., TRAN, P. O., TANAKA, Y. & TAKAHASHI, H. 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*, 52, 581-7.
- ROBERTSON, R. P. & HARMON, J. S. 2006. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell. *Free radical biology & medicine*, 41, 177-84.
- ROBERTSON, R. P. & HARMON, J. S. 2007. Pancreatic islet beta-cell and oxidative stress: the importance of glutathione peroxidase. *FEBS letters*, 581, 3743-8.
- SHETTY, S., KUSMINSKI, C. M. & SCHERER, P. E. 2009. Adiponectin in health and disease: evaluation of adiponectin-targeted drug development strategies. *Trends in pharmacological sciences*, 30, 234-9.

- STORZ, P. 2011. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 14, 593-605.
- TEN BERGE, D., BROUWER, A., EL BAHI, S., GUENET, J. L., ROBERT, B. & MEIJLINK, F. 1998. Mouse Alx3: an aristaless-like homeobox gene expressed during embryogenesis in ectomesenchyme and lateral plate mesoderm. *Developmental biology*, 199, 11-25.
- TWIGG, S. R., VERSNEL, S. L., NURNBERG, G., LEES, M. M., BHAT, M., HAMMOND, P., HENNEKAM, R. C., HOOGEBOOM, A. J., HURST, J. A., JOHNSON, D., ROBINSON, A. A., SCAMBLER, P. J., GERRELLI, D., NURNBERG, P., MATHIJSEN, I. M. & WILKIE, A. O. 2009. Frontorhiny, a distinctive presentation of frontonasal dysplasia caused by recessive mutations in the ALX3 homeobox gene. *American journal of human genetics*, 84, 698-705.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 44-84.
- VALLEJO, M. 2011. The aristaless-like homeobox protein Alx3 as an etiopathogenic factor for diabetes mellitus. *Islets*, 3, 66-8.
- WANG, C. Y. & LIAO, J. K. 2012. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods in molecular biology*, 821, 421-33.
- YAGISHITA, Y., FUKUTOMI, T., SUGAWARA, A., KAWAMURA, H., TAKAHASHI, T., PI, J., URUNO, A. & YAMAMOTO, M. 2014. Nrf2 protects pancreatic beta-cells from oxidative and nitrosative stress in diabetic model mice. *Diabetes*, 63, 605-18.
- ZANGAR, R. C., DAVYDOV, D. R. & VERMA, S. 2004. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and applied pharmacology*, 199, 316-31.
- ZHAO, G. Q., ZHAO, Q., ZHOU, X., MATTEI, M. G. & DE CROMBRUGGHE, B. 1993. TFEC, a basic helix-loop-helix protein, forms heterodimers with TFE3 and inhibits TFE3-dependent transcription activation. *Molecular and cellular biology*, 13, 4505-12.